Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

Bernardo Pereira Moreira

Identificação dos microRNAs expressos em macrófagos
estimulados com alta ou baixa dose de DNA plasmideal e
avaliação dos seus papéis na cascata de sinalização

Ribeirão Preto
2012

Bernardo Pereira Moreira

Identificação dos microRNAs expressos em macrófagos
estimulados com alta ou baixa dose de DNA plasmideal e
avaliação dos seus papéis na cascata de sinalização

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Imunologia Básica e
Aplicada da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências;

Área de concentração: Imunologia.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Arlete Aparecida
Martins Coelho-Castelo

Ribeirão Preto
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto/USP

Moreira, Bernardo Pereira

Identificação dos microRNAs expressos em macrófagos estimulados com alta ou baixa dose de DNA plasmideal e avaliação dos seus papéis na cascata de sinalização. – Ribeirão Preto, 2012.

89 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012. Área de Concentração: Imunologia.

Orientadora: Coelho-Castelo, Arlete Aparecida Martins

1. microRNAs. 2. macrófagos. 3. DNA plasmideal. 4. cascata de sinalização.

Dedico...

*aos meus pais, Ricardo e Juliana, à minha irmã,
Cristiana e à Camilla, pelo amor, presença e apoio durante
o período de elaboração do trabalho.*

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Arlete A. M. Coelho-Castelo, pela oportunidade no laboratório e orientação durante o curso;

Ao Departamento de Imunologia, professor João Santana e os outros professores integrantes que contribuíram para o meu crescimento profissional;

Aos amigos do laboratório: Thiago, Everton, Renata, Luciana, Isabela, Ana Flávia e José Seminati pelo companheirismo, ensinamentos e discussões no desenvolvimento do projeto;

Aos professores Wilson Araújo da Silva Júnior e Tiago Campos Pereira pela participação na construção da dissertação e na banca da defesa;

À Camilla, pelo apoio e participação durante todo o desenvolvimento do projeto tanto na resolução de problemas como auxiliando nas discussões dos resultados;

Aos amigos e companheiros de trabalho espalhados pelo departamento;

Aos secretários Ana Cristine e Ronaldo pelo auxílio e serviços prestados durante todo o curso e desenvolvimento do projeto;

À minha mãe, meu pai e minha irmã pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões tomadas;

Ao CNPq pela bolsa de estudo e à FAPESP, FAEPA e CAPES pelo suporte financeiro.

“The reason for time is so that everything doesn't happen at once”

“The imagination is more important than knowledge”

Albert Einstein

Resumo

MOREIRA, B. P. **Identificação dos microRNAs expressos em macrófagos estimulados com alta ou baixa dose de DNA plasmideal e avaliação dos seus papéis na cascata de sinalização.** 2012. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Nosso grupo demonstrou que a captura de baixas doses de DNA plasmideal pode inibir a apresentação de antígeno e induzir um padrão de resposta anti-inflamatória, e que após a captação do DNA plasmideal por macrófagos, estas moléculas podiam prevenir a acidificação de vesículas endossomais, um passo essencial para a apresentação de antígenos para células T CD4⁺. Além disso, em modelos *in vivo*, a baixa dose de DNA foi suficiente para amenizar o quadro inflamatório e diminuir a produção de citocinas inflamatórias. Estes resultados estão em contraste com os modelos de vacinas gênicas comumente utilizadas. A baixa dose de DNA plasmideal, no contexto da indução da resposta imune, pode levar à modificação na apresentação do antígeno e ativação celular levando ao controle da resposta imune exacerbada desencadeada por outro antígeno, tornando o tratamento por DNA um importante foco de estudo para o combate de doenças autoimunes e inflamações. O objetivo deste trabalho foi identificar os microRNAs expressos em macrófagos tratados com alta ou baixa dose de DNA plasmideal e avaliar o papel destas moléculas na modulação da cascata de sinalização intracelular visando esclarecer o mecanismo imunomodulador observado. Macrófagos da linhagem J774 foram estimulados por 2 horas com o vetor plasmideal pcDNA3, nas concentrações de 10 µg ou 100 µg de pcDNA3/mL de RPMI. O RNA total foi extraído e o ensaio de *microarray* para microRNAs foi realizado. Os miRNAs diferencialmente expressos foram confirmados pela RT-qPCR, e o programa de bioinformática miRDB foi utilizado para predição de genes alvos. Os miRNAs e genes selecionados também foram dosados em macrófagos estimulados com LPS e tratados com pcDNA3. Foram detectados 6 miRNAs (miR-494-3p, miR-21-3p, miR-1897-5p, miR-1894-3p, miR-294-3p e miR-483-5p) diferencialmente expressos em macrófagos estimulados somente com pcDNA3. A expressão do miR-494-3p foi aumentado somente em células tratadas com DNA em baixa concentração tanto na

ausência quanto presença de LPS. O gene $\text{I}\kappa\text{B}\kappa\beta$ (IKK- β) foi identificado como alvo do miR-494-3p, dosado e teve sua função detectada por *western blot*, mostrando que seu papel biológico foi alterado na presença deste miRNA. Além disso, os dados do tratamento com pcDNA3 em camundongos *knockout* para o receptor TLR9, sugerem que a expressão do miR-494-3p é independente deste tipo de receptor, porém é inibida na presença do mesmo quando no tratamento com alta dose de DNA. Os dados sugerem que quando macrófagos são tratados com baixa dose de DNA plasmideal (10 $\mu\text{g/mL}$), o miR-494-3p age como regulador negativo do fator de transcrição NF- κB , por meio da inibição da expressão e função da proteína IKK- β .

Palavras-chave: microRNAs, macrófagos, DNA plasmideal, LPS, IKK- β .

Abstract

MOREIRA, B. P. **Identification of expressed microRNAs on high or low dose plasmid DNA-stimulated macrophages and their potential role in the intracellular signaling cascade.** 2012. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Our group demonstrated that the capture of low doses of plasmid DNA can inhibit antigen presentation and induce an anti-inflammatory response pattern together with the decrease of pro-inflammatory cytokines expression, as observed in *in vivo* experimental models. Moreover, we observed that after the uptake of plasmid DNA by macrophages, these molecules could prevent endosomal vesicles acidification, an essential step for antigen presentation to CD4⁺ T cell. These results are in contrast with the usual DNA vaccines models commonly used. The low dose of plasmid DNA, in the context of immune response induction, can take to a modification in antigen presentation leading to the control of the response already established, what can be a potential treatment in auto-immune diseases and inflammation. The objective of this work is to identify expressed microRNAs on J774 macrophages triggered by different concentrations of plasmid DNA stimuli in order to evaluate the observed immunomodulatory mechanism. J774 macrophages were treated with low (10 µg/mL) and high (100 µg/mL) doses of pcDNA3 for 2 hours. Total RNA was extracted and microarray (Agilent platform) was performed for detection of differentially expressed microRNAs. All obtained data was normalized in Genespring GX11.5 software. The microRNAs expression was confirmed by RT-qPCR and their mRNA targets were predicted by miRDB software. The miRNAs and their respective targets were also evaluated on DNA and LPS-treated macrophages. We detected 6 differentially expressed microRNAs (miR-494-3p, miR-21-3p, miR-1897-5p, miR-1894-3p, miR-294-3p e miR-483-5p) between the two conditions (fold change ≥ 2 , p-value $\leq 0,05$). The miR-494-3p expression increased only in cells treated with low dose of pcDNA3, on either previously LPS-stimulated cells or not. I κ B κ β (IKK- β) was one of the predicted targets for miR-494-3p. RT-qPCR was performed to calculate its expression and its biological function was assessed by *western blot*. Besides, results from pcDNA3-treated cells from TLR9 knockout mice suggest that miR-494-3p

expression is TLR9 independent although the receptor presence impaired miR-494-3p expression on high dose of pcDNA3-treated cells. Together, the data indicate that when macrophages are treated with low dose of plasmid DNA, miR-494-3p expression is increased, acting as negative regulator of the transcription factor NF- κ B, through IKK- β inhibition.

Keywords: microRNAs, macrophages, plasmid DNA, LPS, IKK- β .

Lista de Figuras

Figura 1: Visão geral da via canônica de biogênese dos microRNAs. Extraído de (Winter, Jung <i>et al.</i> 2009).....	22
Figura 2: Via canônica do receptor TLR4 e das proteínas desta via sinalizadora. Os microRNAs funcionam juntamente a outros mecanismos para controlar a expressão dos componentes da via de sinalização por TLR. (O'Neill, Sheedy <i>et al.</i> 2011).....	25
Figura 3: Desenho esquemático do vetor plasmideal comercial pcDNA3. Ilustração retirada de “ http://www.lablife.org/p?a=vdb_view&id=g2.9Qyh_n9D3As.29eaY9eZRAcswvk- ”.....	29
Figura 4: Visão geral do delineamento do Experimento 1.....	37
Figura 5: Visão geral do delineamento do Experimento 2.....	38
Figura 6: Visão geral do delineamento do Experimento 3.....	40
Figura 7: Figura Superior: foto do gel obtido da análise das amostras de RNA total em aparelho bioanalisador. Figura Inferior: Densitometria da eletroforese em gel das amostras de RNA total obtidas, mostrando os respectivos picos das frações de rRNA 28S, 15S e 5S. P: padrão molecular; Amostras 1-3: Controle, Amostras 4-6: Baixa Dose, Amostras 7-9: Alta Dose. À direita o índice RIN fornecido pelo aparelho correspondente à qualidade e integridade das amostras.....	41
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificação da qualidade das amostras extraídas. Amostras 1-3: Controle, Amostras 4-6: LPS, Amostras 7-9: LPS + Baixa Dose, Amostras 10-12: LPS + Alta Dose, Amostras 13-14: LPS/Baixa Dose, Amostras 15-16: LPS/Alta Dose. As bandas de RNA foram marcadas com brometo de etídeo e visualizadas sob luz ultravioleta.....	42
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificação da qualidade das amostras extraídas. Amostras 1-3: TLRKO Controle, Amostras 4-6: TLR9KO Baixa Dose, Amostras 7-9: TLR9KO Alta Dose, Amostras 10-12: WT Controle, Amostras 13-15: WT Baixa Dose, Amostras 16-18: WT Alta Dose. As bandas de RNA foram marcadas com brometo de etídeo e visualizadas sob luz ultravioleta.	43
Figura 10: Perfil de expressão dos microRNAs detectados. (A) Total de 199 miRNAs identificados e (B) 6 microRNAs diferencialmente expressos entre os tratamentos. Os valores estão representados na escala log2.	44
Figura 11: Expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre os tratamentos (fold-change $\geq 2,0$; *ANOVA $p < 0,05$). Os valores estão representados na escala log2.	45

Figura 12: Representação do <i>fold-change</i> da expressão dos miRNAs dos grupos tratamentos em relação ao controle. Foram considerados miRNAs diferencialmente expressos aqueles que apresentam <i>fold-change</i> $\geq 2,0$ em pelo menos uma das comparações.....	46
Figura 13: Detecção dos miRNAs diferencialmente expressos por RT-qPCR.	47
Figura 14: Dosagem dos miRNAs por RT-qPCR. Foram dosados os miRNAs miR-494-3p, miR-294-3p e miR-21-3p, nas amostras dos grupos do Experimento 2. *ANOVA ($p < 0,05$), seguido de teste T, foi utilizado para confirmar a significância estatística.....	48
Figura 15: Dosagem do miR-494-3p por RT-qPCR nas amostras do Experimento 3. *ANOVA ($p < 0,05$), seguido de teste T, foi utilizado para confirmar significância estatística.	49
Figura 16: Número de genes alvos preditos para cada microRNA por meio do banco de dados miRDB (Wang 2008; Wang and El Naqa 2008).	49
Figura 17: Mapa integrativo dos processos biológicos (GO) mais enriquecidos da lista total de genes alvos, gerado pelo <i>plugin</i> BiNGO, presente no <i>Cytoscape</i> . Quanto maior o “nó” na rede, maior a quantidade de genes pertencentes ao respectivo processo biológico, e a cor indica a significância estatística ($p < 0,01$).....	51
Figura 18: Rede integrativa contendo os miRNAs e os genes alvos filtrados. Ao todo são 6 miRNAs e 788 genes referentes aos 18 processos biológicos selecionados (Tabela 3).	55
Figura 19: Rede integrativa dos miRNAs e os genes preditos filtrados em cada grupo experimental. A rede superior é referente ao grupo Alta Dose, e a rede inferior, referente ao grupo Baixa Dose.	56
Figura 20: Diagrama do número de genes entre os dois grupos experimentais. Estes números representam os 788 genes envolvidos com as categorias de GO selecionadas, sendo 340 genes alvos para os miRNAs expressos no grupo experimental Alta Dose, 145 genes alvos para os miRNAs expressos no grupo experimental Baixa Dose e 303 genes alvos compartilhados por dois ou mais miRNAs (Tabela 3).....	57
Figura 21: Rede integrativa dos 145 genes alvos candidatos à modulação exclusivos ao grupo experimental Baixa Dose, e relacionado com os processos biológicos de interesse..	58
Figura 22: Rede de vias celulares que contém os genes selecionados. O mapa foi gerado pelo <i>plugin</i> ClueGO, no programa <i>Cytoscape</i> , onde a lista de genes, provenientes da Figura 21, foi usada como dados para a geração desta rede. As vias foram formadas de acordo com a ocorrência de dois ou mais genes, e vias relacionadas com genes compartilhados foram agrupadas em <i>clusters</i> separadas por cores.....	59
Figura 23: Rede das vias celulares e os respectivos genes alvos. Após a predição da rede na Figura 22, a mesma foi filtrada para retirada de vias relacionadas a câncer e outras	

doenças, permanecendo as vias de interesse. Por meio do *plugin* ClueGO, foi feita a adição dos genes alvos para cada “nó” presente no mapa..... 60

Figura 24: Dosagem do gene $\text{I}\kappa\text{B}\kappa\beta$ por RT-qPCR para confirmação da expressão. *ANOVA ($p < 0,05$). 62

Figura 25: Dosagem dos interferons do tipo 1 por RT-qPCR. *ANOVA ($p < 0,05$). 63

Figura 26: SDS-PAGE do extrato proteico total das amostras estimuladas com LPS e pcDNA3, conforme experimento 2. Visualização por meio da coloração com *Comassie Blue*. 63

Figura 27: *Western blot* para a proteína *phospho-IkB*. A transferência foi feita para membrana de nitrocelulose e a detecção feita pelo método da reação da peroxidase (DAB). 64

Figura 28: Representação gráfica da densitometria das bandas detectadas pelo *western blot*. **ANOVA ($p < 0,05$). 64

Figura 29: Esquema representativo da ação do complexo IKK na regulação do fator transcricional $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ 73

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sequências dos controles endógenos e microRNAs usados para a síntese dos <i>primers</i> e sondas específicas para a dosagem dos mesmos, por RT-qPCR.....	33
Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores usados na reação de RT-qPCR para dosagem dos respectivos genes.	34
Tabela 3: Categorias de GO dos processos biológicos obtidos pelo <i>plugin</i> BiNGO (<i>Cytoscape</i>). Aqui, só estão representados os termos escolhidos para posteriores análises.	52
Tabela 4: Resultado da evidência <i>in silico</i> do sítio de interação miRNA:mRNA. Para cada par de interações, está especificado o sítio de ligação no gene e a energia livre mínima (<i>mfe</i>). A análise foi feita usando o programa <i>RNAhybrid v2.2</i>	61

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALR – Receptores do tipo AIM2
APC – Célula Apresentadora de Antígeno
CpG – Citosina-phospho-guanidina
cDNA – DNA complementar
dsDNA – DNA dupla fita
LPS – Lipopolissacarídeo
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
mfe – Energia mínima livre
mRNA – RNA mensageiro
miRNA – microRNA
NK – Natural Killer
NLR – Receptores do Tipo NOD
ODN – Oligodeoxinucleotídeos
PAMP – Padrão molecular associado à patógeno
PCR – Reação em cadeia da polimerase
Pré-microRNA – precursor intermediário do microRNA
Pri-microRNA – precursor primário do microRNA
PRR – Receptores de reconhecimento de padrões
RIN – Índice de integridade do RNA
RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
RLC – Complexo de Carregamento da RISC
RLR – Receptores do tipo RIG
RNA pol III – RNA polimerase III
snoRNA – RNA pequeno nucleolar
TLR – Receptores do Tipo Toll
WT – Wild-type

Sumário

Resumo.....	v
Abstract	vii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xiii
1. Introdução	16
1.1. Vacinas de DNA	16
1.2. Resposta imune das vacinas de DNA	17
1.3. Sinalização intracelular das vacinas de DNA	18
1.4. MicroRNAs: conceito e biogênese	21
1.5. Regulação da resposta imune por microRNAs	22
1.6. Papel dos MicroRNAs na regulação da sinalização intracelular	24
1.7. Justificativa	26
2. Objetivo	28
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1. DNA plasmideal	29
3.2. Células, meio de cultura e reagentes.....	29
3.3. Animais	30
3.4. Extração do RNA total e avaliação da pureza e integridade.....	30
3.5. Ensaio de microarranjo para microRNAs	31

3.6. Síntese de cDNA e dosagem por qPCR	32
3.7. Predição dos genes alvos	34
3.8. Desenho e análise das redes de interações entre microRNA-gene alvo.....	34
3.9. Evidência <i>in silico</i> dos sítios de interação microRNA-mRNA.....	35
3.10. Detecção da proteína <i>Phospho-IkB</i> por <i>western blot</i>	35
3.11. Análise Estatística.....	37
3.12. Delineamento Experimental	37
4. Resultados	41
4.1. Extração do RNA total e verificação da integridade	41
4.2. Detecção dos microRNAs por microarranjo e quantificação da expressão	43
4.3. Detecção da expressão dos microRNAs por RT-qPCR	46
4.4. Predição dos genes alvos	49
4.5. Análise e caracterização dos genes alvos candidatos.....	50
4.6. Evidência <i>in silico</i> do sítio de interação miRNA:mRNA (genes alvos)	60
4.7. Dosagem dos genes por RT-qPCR.....	62
4.8. Detecção da proteína <i>phospho-IkB</i> por <i>western blot</i>	63
5. Discussão.....	65
6. Conclusão	76
7. Referência	77
Anexo	lxxxviii

1. Introdução

1.1. Vacinas de DNA

Nas últimas décadas foi observado que o DNA plasmideal poderia ser injetado e expresso *in vivo*, além de direcionar a resposta imune do organismo (Tang, DeVit *et al.* 1992; Dupuis, Denis-Mize *et al.* 2000). Desde então esta nova tecnologia tem sido amplamente estudada com o objetivo de se desenvolver uma nova geração de vacinas. Estas vacinas se tornaram objeto de estudo e hoje são consideradas uma ferramenta de sucesso no combate a doenças infecciosas e terapias contra o câncer além de estarem em desenvolvimento contra doenças autoimunes e alergia (Donnelly, Wahren *et al.* 2005). Recentemente, tem sido mostrado que as vacinas de DNA são capazes de desenvolver proteção a infecções decorrentes de várias classes de patógenos as quais incluem vírus, bactérias e parasitas (Huygen, Content *et al.* 1996; Chen, Kadowaki *et al.* 2001; Campbell, Diao *et al.* 2003; Almeida, Trombone *et al.* 2011).

As vacinas gênicas são baseadas no uso de sequências nucleotídicas, que codificam antígenos imunodominantes de um determinado agente infeccioso, clonados em vetores bacterianos. Além disso, são compostas estruturalmente de sequências CpG, inerente a estrutura plasmideal, um promotor (geralmente viral, como CMV ou SV40) para intensificar a expressão em células eucarióticas, um sítio de poliadenilação e um gene de resistência a antibióticos que permite sua seleção (Gurunathan, Klinman *et al.* 2000; Liu 2003; Greenland e Letvin 2007; Kutzler e Weiner 2008). A maioria dos plasmídeos usados em laboratórios são vetores comerciais, nos quais apenas insere-se o gene de interesse a ser traduzido. Em nosso modelo foi utilizado apenas o vetor comercial pcDNA3 (Invitrogen, Scotland) sem a clonagem de qualquer gene.

A principal rota de administração destas vacinas é a intramuscular, embora não exista um consenso sobre a eficácia deste tipo de inoculação. A introdução do DNA plasmideal em um organismo eucariótico pode, também, ser realizada pela inoculação via oral, nasal (em forma de aerossol ou líquida) e pela forma intradérmica. Esta última por meios de bombardeamento de micropartículas de ouro, também chamada de biobalística (*gene gun*), cobertas pelo DNA de interesse

(Gurunathan, Klinman *et al.* 2000; de Paula, Silva *et al.* 2007; Greenland e Letvin 2007; Kutzler e Weiner 2008).

Recentemente, pesquisas no campo das vacinas de DNA têm se tornado importantes no sentido de elucidar os mecanismos de ação, imunogenicidade e estratégias de aperfeiçoamento das mesmas. Apesar de já estarem em uso para o tratamento de algumas doenças animais, elas ainda apresentam limitações na sua efetividade em humanos. Além disso, vacinas de DNA apresentam várias vantagens importantes em relação aos tipos de vacinas atuais. Primeiro, apresentam efeitos semelhantes a vacinas de microorganismos vivos atenuados quanto em relação à sua capacidade de induzir resposta imune restrita a linfócitos T CD8+ pelo contexto de MHC classe I, o qual seria vantajoso sobre as vacinas convencionais baseadas em proteínas, quando se leva em conta a questão de segurança envolvendo vacinas de microorganismos vivos atenuados. Segundo, vacinas de DNA podem ser produzidas em larga escala com boa relação custo/benefício, além da facilidade de estocagem e armazenamento, eliminando a necessidade da intensa refrigeração das vacinas convencionais para manter a estabilidade da vacina durante a sua distribuição (Gurunathan, Klinman *et al.* 2000).

1.2. Resposta imune das vacinas de DNA

Em relação à resposta imune, as vacinas de DNA são potentes indutoras de linfócitos T CD8+ citotóxicos, pois a célula que internalizou o DNA passa a expressar a proteína que é posteriormente processada e apresentada na superfície da célula no contexto de MHC classe I, que ativará estes linfócitos (Gurunathan, Stobie *et al.* 2000). Eventualmente a proteína heteróloga expressa pode ser liberada e capturada por células apresentadoras de antígenos (APCs) e também ativar, via contexto do MHC classe II, linfócitos T CD4+ e linfócitos B para a produção de anticorpos específicos (Gurunathan, Wu *et al.* 2000; Liu 2003). A primeira descrição de que o DNA plasmideal também poderia ser capturado diretamente por células B do baço e da medula óssea foi demonstrado por nosso grupo, sugerindo que estas células também possam apresentar antígenos neste modelo (Coelho-Castelo, Santos Junior *et al.* 2003). Deste modo, as vacinas de DNA, do ponto de vista imunológico, têm funcionado como um sinal imunoestimulatório, pela ligação a receptores específicos, para mediar a ativação celular. Essa ativação culmina na síntese de citocinas como

TNF- α e IL-6, com potencialização da resposta imune pela indução da expressão das citocinas IL-12, IFN- γ e IL-18, que estão relacionadas com o desenvolvimento de uma resposta imunológica do padrão Th1 ideal para o controle de doenças crônicas e infecciosas (Yasuda, Yu *et al.* 2005; Ishii e Akira 2006; Yasuda, Wagner *et al.* 2006; Kumar, Kawai *et al.* 2011).

1.3. Sinalização intracelular das vacinas de DNA

No contexto da sinalização intracelular, o DNA plasmideal está relacionado com a ativação de diferentes vias de sinalização, que vão desde receptores de DNA dupla fita acoplados às membranas ou citosólicos, a proteínas fosforiladas e fatores de transcrição que agem na ativação ou inibição de vários genes em resposta a cada estímulo sofrido pela célula. Eventualmente, moléculas de DNA podem ser liberadas de microorganismos, células danificadas do hospedeiro ou até mesmo provenientes de uma vacina. Tais moléculas são detectadas pelo sistema imune inato e passam então a modular a resposta imunológica (Akira, Uematsu *et al.* 2006). A recente descoberta de vários receptores do sistema imune inato tais como os receptores do tipo Toll (TLR) (Iwasaki e Medzhitov 2004), os receptores do tipo NOD - domínio de oligomerização de nucleotídeos (NLR) (Kanneganti, Lamkanfi *et al.* 2007), os receptores do tipo RIG - gene I induzido por ácido retinóico (RLR) (Koyama, Ishii *et al.* 2007; Kumar, Koyama *et al.* 2008) e os recentemente descritos receptores do tipo AIM2 - ausente em melanoma 2 (ALR) (Hornung, Ablasser *et al.* 2009; Unterholzner, Keating *et al.* 2010) abriram novas portas para o entendimento dos efeitos e mecanismos que poderiam melhorar o desenvolvimento e desenho das vacinas.

Recentemente, trabalhos envolvendo os receptores do tipo Toll 9 (TLR9), relacionavam estas proteínas com a sinalização por moléculas de DNA dupla fita o qual desencadeava uma cascata de sinalização intracelular através da ligação de sequências CpGs não metiladas, o ligante clássico dos receptores TLR9 (Wagner 2004). Vários trabalhos também relacionavam TLR9 com o papel crucial em mediar a resposta imune a vários agentes infecciosos, reações alérgicas e até mesmo câncer. Também era discutida sua participação em certas doenças autoimunes (Klinman 2004; Krieg 2006). Entretanto, apesar das sequências CpGs estarem presentes na estrutura dos plasmídeos, esclarecimentos sobre o papel dos TLR9

não tem sido conclusivos já que a maioria dos trabalhos usam oligodeoxinucleotídeos sintéticos (ODNs), os quais diferem na especificidade de ligação aos receptores em relação ao DNA natural (Haas, Metzger *et al.* 2008). Na via dependente de TLR9, o DNA se liga diretamente a esta molécula recrutando MyD88 para formar um complexo maior com múltiplas moléculas, incluindo IRF5, IRAK4 e TRAF6, para assim ativar NF- κ B (através das moléculas IKK α , β e γ) e MAP quinases (através das moléculas Ubc13 e TAK1), resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias. Outras moléculas adicionais, como IRF7, IRAK1 e TRAF3, em outros tipos celulares, também levam à grande produção de IFN tipo 1 (Ishii e Akira 2006). Porém outros estudos questionam a importância do TLR9 para a ativação por DNA plasmideal já que os autores verificaram que camundongos TLR9^{-/-} eram capazes de responder a vacinas de DNA tanto quanto camundongos selvagens, minimizando assim, a participação essencial destes receptores na sinalização por estas moléculas (Spies, Hochrein *et al.* 2003).

Todos estes trabalhos realçam a importância da sinalização das vacinas de DNA e os receptores do tipo Toll 9 (TLR9), porém, novas abordagens para a sinalização de moléculas dupla-fita de DNA passaram a ser exploradas e novas moléculas sinalizadoras foram caracterizadas em vias intracelulares e independentes da sinalização por TLR (Wagner e Bauer 2006; Vilaysane e Muruve 2009). Através destas vias, a molécula de DNA, após atingir o citoplasma, pode ser detectada por uma maquinaria de reconhecimento intracelular capaz de ativar grande produção de IFN tipo 1 e de outras quimiocinas além da estimulação da produção de moléculas do MHC e co-estimulatórias (Vilaysane e Muruve 2009).

O reconhecimento de DNA intracelular é independente da sequência e do padrão de metilação e pode ativar três vias diferentes: receptor de DNA ativador de fatores de transcrição reguladores de interferon (IRF), chamado de DAI; transcrição do DNA pela RNA polimerase III (RNA pol III) em RNA imunogênico; e formação de inflamassoma AIM2 que culmina na ativação de caspase-1 (Hornung, Ablasser *et al.* 2009).

Dentre os achados mais relevantes está a descrição de um sensor citoplasmático chamado DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors) anteriormente conhecido como ZBP1, uma proteína ligadora de DNA, que está relacionado com detecção de moléculas de DNA culminando na expressão de

interferon tipo 1 através da ativação dos fatores de transcrição IRF3 e IRF7. Este sensor recruta IRF3 e TBK1 de uma maneira dependente de DNA (Takaoka, Wang *et al.* 2007). Outro receptor descrito nesta via é o receptor citoplasmático TBK1 (TANK-binding kinase-1), importante na modulação do efeito adjuvante das vacinas de DNA e para sua imunogenicidade, que atua, juntamente com IKK-i, ativando tanto IRF3 e IRF7, delineando a resposta imune inata e adaptativa (Ishii, Kawagoe *et al.* 2008).

Sequências de DNA ricas em adenina e timina (dA:dT) também podem levar a produção de IFN- β , mas por um mecanismo dependente da RNA pol III. Essa enzima faz a transcrição do DNA independente de direcionamento por uma região promotora, levando a produção de um RNA intermediário que é posteriormente reconhecido pelo receptor citossólico RIG-I (Ablasser, Bauernfeind *et al.* 2009). A via de sinalização de RIG-I para a produção de IFN- β também é dependente de TBK1 e IRF3. Além da indução da produção de interferons do tipo I, o DNA exógeno no citosol pode levar a ativação de inflamassoma e produção de IL-1 β . A ligação do DNA ao receptor AIM-2 na célula leva ao recrutamento da molécula adaptadora ASC, que por sua vez recruta caspase-1 que cliva a pró-IL-1 β em IL-1 β ativa (Hornung, Ablasser *et al.* 2009).

Dada a grande relevância do reconhecimento de DNA citoplasmático para a ativação da resposta imune, não é surpresa que muitos receptores citoplasmáticos de ácidos nucleicos tenham sido descritos. Entretanto, estudos complementares são necessários para se obter um maior entendimento de todo o processo de sinalização envolvendo estas moléculas, principalmente no que diz respeito à regulação das vias celulares. Dentre os vários mecanismos de *feedback* e proteínas acessórias existentes para cada processo celular, é de se esperar que o controle da sinalização e indução da resposta celular seja finamente regulado, evitando-se assim respostas exacerbadas ou a hiporresponsividade. Uma importante classe de moléculas muito estudadas recentemente e que exerce um papel crucial na regulação da expressão gênica são os microRNAs (miRNAs), os quais têm sido largamente estudados e caracterizados.

1.4. MicroRNAs: conceito e biogênese

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs não codificadores, de aproximadamente 22 nucleotídeos (molécula madura), que agem na regulação da expressão gênica. Os miRNAs são reguladores pós-transcricionais que modulam os transcritos alvos de RNAs mensageiros (mRNAs) por meio da associação ao RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA) por reconhecimento da sequência de nucleotídeos, no qual o maior determinante deste reconhecimento é o perfeito pareamento de bases na chamada região *seed*, de 6-8 nucleotídeos, localizado na extremidade 5' do miRNA (Xiao e Rajewsky 2009).

Este pareamento miRNA:mRNA pode levar à clivagem, desestabilização ou inibição traducional do mRNA alvo (Guo, Ingolia *et al.* 2010), por meio do auxílio de outros componentes deste complexo de silenciamento, dentre eles as proteínas da família Argonauta (Ago1-4) (Eulalio, Huntzinger *et al.* 2008).

Atualmente, os processos de biogênese dos miRNAs estão bem esclarecidos em várias espécies, respeitando a via canônica de biossíntese destas moléculas, porém muitos ramos e desvios no processamento das mesmas têm sido elucidados sugerindo que há várias formas para a produção de um miRNA maduro (Winter, Jung *et al.* 2009). De uma forma linear e direta, os miRNAs maduros são originados a partir de seus genes que são transcritos em precursores primários (Pri-microRNAs) pela RNA polimerase II (RNA pol II) ou RNA polimerase III (RNA pol III) (Lee, Kim *et al.* 2004; Borchert, Lanier *et al.* 2006). Posteriormente, ocorre uma clivagem nuclear realizada pelo complexo micropocessador Drosha-DGCR8 RNase III (Han, Lee *et al.* 2004) nas extremidades 3' e 5' do Pri-microRNA, gerando um precursor intermediário (Pré-microRNA) de laço (loop) com aproximadamente 60-70 nucleotídeos. O Pré-microRNA é então ativamente transportado para o citoplasma pela Exportina-5 (XPO5) associada à Ran-GTP. Vale ressaltar que a XPO-5 reconhece os Pri-microRNAs independentes da sua sequência ou da estrutura da alça (Yi, Qin *et al.* 2003). Uma vez no citoplasma, o Pré-miRNA é então modificado e adicionado ao RISC, para estas fases ocorrerem é necessária a ação da RLC (Complexo de carregamento da RISC). A RLC é um complexo multiproteico composto pela DICER, a TRBP (proteína de ligação ao RNA) e a PACT (Proteína ativadora da PKR), além do componente central Ago2 (Argonauta-2). O pré-microRNA então é clivado, agora pela DICER, que libera o laço da molécula de

microRNA duplex. A fita dupla de RNA é posteriormente separada, na qual uma das fitas é degradada e com isso a fita molde de miRNA maduro se associa à RISC que juntamente com a Ago2 passa a reconhecer fitas complementares de mRNA, prioritariamente na região 3'UTR dos mensageiros alvos, clivando ou diminuindo os níveis dos mesmos inibindo a sua transcrição pelos ribossomos (Figura 1) (Bartel 2004; He e Hannon 2004; Winter, Jung *et al.* 2009).

Figura 1: Visão geral da via canônica de biogênese dos microRNAs. Extraído de (Winter, Jung *et al.* 2009).

1.5. Regulação da resposta imune por microRNAs

Com a descoberta dos miRNAs como reguladores pós-transcricionais, no controle de vários mecanismos de diferenciação e proliferação celular, entre outros, pesquisadores perguntaram-se como estas moléculas estariam envolvidas também na regulação do sistema imune.

Nos últimos anos, uma grande quantidade de trabalhos tem sido publicada com o intuito de esclarecer o papel destas moléculas na regulação dos principais processos relacionados com o sistema imunológico (Baltimore, Boldin *et al.* 2008; Lindsay 2008; Xiao e Rajewsky 2009; O'Connell, Rao *et al.* 2010). Cerca de mais de 100 diferentes miRNAs são expressos por células do sistema imunológico e eles apresentam uma grande influência nas vias moleculares que controlam os processos básicos das respostas imunológicas inata e adaptativa, como hematopoese, maturação, ativação e diferenciação celular. Dentre os mais importantes miRNAs podemos citar o miR-155, o miR-146, o miR-21 e o miR-142-3p (O'Connell, Rao *et al.* 2010). Além disso, sua expressão bastante alterada é considerada uma das causas dos cânceres de origem imunológica, no qual estas moléculas apresentam um papel de supressor tumoral ou promotor tumoral dependendo do papel de cada mRNA alvo do miRNA correspondente (Calin e Croce 2006).

Enquanto alguns miRNAs são altamente expressos, outros exibem menores níveis de expressão, dependendo do tipo celular, tecido, microambiente e estágio de ativação. As células-tronco hematopoiéticas são as precursoras de todas as células sanguíneas incluindo as células do sistema imunológico e estas progenitoras precisam manter um alto padrão regulatório intracelular no que diz respeito à maquinaria de multiplicação e diferenciação celular, na qual os miRNAs parecem estar intimamente relacionados. Apesar do grande número de estudos com miRNAs e outros tipos de células tronco, apenas recentemente os miRNAs tem sido descritos para estes precursores hematopoiéticos (Gangaraju e Lin 2009). Em relação à imunidade inata, a qual compreende os granulócitos, monócitos (os quais se diferenciam em células dendríticas e macrófagos) e células NK (*Natural Killer*), uma grande quantidade de trabalhos tem caracterizado uma contribuição significativa dos miRNAs no desenvolvimento e função destas células (Fontana, Pelosi *et al.* 2007; Johnnidis, Harris *et al.* 2008; Bazzoni, Rossato *et al.* 2009; Liu, Friggeri *et al.* 2009). Semelhante ao que ocorre com as células do sistema imune inato, o desenvolvimento de linfócitos T e B nos órgão linfoides primários ou geradores e sua ativação na periferia são controlados por vias de sinalização intracelular sujeitas à regulação por miRNAs, inclusive a diferenciação destas células em diferentes subtipos dependendo da resposta celular necessária (Linfócitos T auxiliares - Th₁,

Th₂, T_{Reg} e Th₁₇ – e linfócitos B de memória e plasmócitos) (Muljo, Ansel *et al.* 2005; Xiao, Calado *et al.* 2007; Basso, Sumazin *et al.* 2009; Du, Liu *et al.* 2009).

Dentre os miRNAs melhor caracterizados, podemos citar o miR-155, altamente relacionado com o sistema imune inato e a também com a maturação de linfócitos B e T. A relação deste miRNA e a imunidade inata foi sugerida por estudos que mostraram o aumento da sua expressão em macrófagos e monócitos após a exposição por LPS e lipoproteínas além de outros ligantes derivados de vírus e bactérias (Lindsay 2008). O papel do miR-155 também foi extensivamente estudado na cascata de sinalização por TLR, onde este miRNA exerce uma fina regulação da sinalização por TLR4, sendo induzido quando o mesmo é ativado e atuando na inibição da proteína SHIP1 que inibe o mesmo receptor (O'Neill, Sheedy *et al.* 2011). Além disso, estudos com camundongos *knockout* mostraram a importância do miR-155 na resposta imune humoral mostrando seu papel essencial na regulação da troca de classe de anticorpos em células B (Vigorito, Perks *et al.* 2007).

Outro miRNA bastante caracterizado é o miR-146a, considerado um regulador negativo da resposta imune inata, sendo altamente expresso quando receptores TLR2, TLR4, TLR5 ou citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β disparam as cascatas de sinalização e ativam os fatores de transcrição. Foram identificados seus alvos de regulação dentre os quais estão IRAK1 e TRAF6, importantes elementos das cascatas de sinalização disparadas por TLR.

Além destes dois miRNAs, vários outros têm sido descritos e caracterizados em relação ao desenvolvimento, diferenciação e maturação das células do sistema imune (miR-150, miR-17~92, miR-223, miR-20a e miR-142), à regulação da resposta imune (miR-181a, miR-21) e em relação à regulação das cascatas de sinalização em resposta a estímulos (miR-125b, let-7 e miR-27b), dentre outros (Baltimore, Boldin *et al.* 2008; Xiao e Rajewsky 2009; O'Neill, Sheedy *et al.* 2011).

1.6. Papel dos MicroRNAs na regulação da sinalização intracelular

Vistas as possíveis rotas de reconhecimento e sinalização celular induzido por dsDNA, bem como os vários tipos de receptores e moléculas sinalizadoras envolvidos, e considerando a participação efetiva dos miRNAs na modulação da resposta imune, espera-se uma grande influência destas moléculas na regulação da resposta celular frente a um estímulo.

Até o presente momento, as vias de sinalização por TLR têm sido as mais bem caracterizadas em relação ao controle por miRNAs, tendo em vista a importância destes receptores na detecção de patógenos e na iniciação da resposta inflamatória, porém muito ainda não está totalmente esclarecido. Vários mecanismos são conhecidos na regulação das moléculas que compõe esta via de sinalização, dentre eles, fosforilação, ubiquitinação, degradação mediada por proteassoma, interações físicas e inclusive mudanças conformacionais (Carpenter e O'Neill 2009). Somado a estes, o outro processo de modulação seria, portanto, por meio da regulação dos níveis de mRNA que codificam as proteínas destas vias, direcionada por miRNAs (Figura 2). Além disso, a sinalização por TLR culmina na ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios essenciais para a transcrição de genes sensíveis à RNA pol II, como citocinas, quimiocinas e enzimas antimicrobianas (O'Neill, Sheedy *et al.* 2011) e visto que os miRNAs são transcritos por esta mesma polimerase (Lee, Kim *et al.* 2004), torna-se evidente a relação dos miRNAs na regulação desta via de sinalização (O'Neill, Sheedy *et al.* 2011).

Figura 2: Via canônica do receptor TLR4 e das proteínas desta via sinalizadora. Os microRNAs funcionam juntamente a outros mecanismos para controlar a expressão dos componentes da via de sinalização por TLR. (O'Neill, Sheedy *et al.* 2011).

Vários trabalhos têm sido publicados elucidando os mecanismos em que a sinalização por TLR pode controlar a expressão dos miRNAs e estes miRNAs podem modular uma grande quantidade de moléculas em diferentes etapas desta via sinalizadora. Dentre os achados mais importantes, podemos citar os papéis dos miRNAs miR-155, miR-146, miR-21, miR-9 e miR-125b, descritos em diferentes tipos celulares do sistema imune, induzidos por diferentes estímulos que são captados pela via de sinalização por TLR (Taganov, Boldin *et al.* 2006; Tili, Michaille *et al.* 2007; Androulidaki, Iliopoulos *et al.* 2009; Bazzoni, Rossato *et al.* 2009; Ceppi, Pereira *et al.* 2009; Hou, Wang *et al.* 2009; McCoy, Sheedy *et al.* 2010; Sheedy, Palsson-McDermott *et al.* 2010; O'Neill, Sheedy *et al.* 2011). E são estes miRNAs expressos que realizam o *feedback* no controle preciso da resposta imunológica evitando assim inflamação excessiva, além de contribuir para a manutenção da homeostase e reparo tecidual.

1.7. Justificativa

Nosso grupo trabalha, atualmente, com uma nova abordagem de terapia gênica, utilizando baixas doses de DNA plasmideal (preconizado para 10 µg/mL) como indutora de um perfil antiinflamatório nas células. Até agora, os dados obtidos demonstram que baixas doses de DNA plasmideal inibem a produção de citocinas inflamatórias *in vivo* (Malardo 2009), enquanto nos estudos de tráfego intracelular, usando baixas doses de DNA, observou-se que a molécula plasmideal após ser fagocitada, impedia a acidificação das vesículas endossomais, interferindo com a apresentação de antígenos para linfócitos T CD4⁺ (Trombone, Silva *et al.* 2007). Vale ressaltar que outras construções plasmideais mostraram o mesmo efeito. No sentido de aperfeiçoar a dose do plasmídeo, sua biodistribuição, esclarecer o tráfego intracelular do DNA desde a sua captura até a realização da sua função e esclarecer o mecanismo de modulação da resposta imunológica, nosso grupo realiza estudos nesta linha de pesquisa desde 2003 (Coelho-Castelo, Santos Junior *et al.* 2003; Coelho-Castelo, Trombone *et al.* 2006; Trombone, Silva *et al.* 2007; Rosada, de la Torre *et al.* 2008; Fontoura 2009; Malardo 2009; Padilha 2011). A utilização desta nova abordagem, levando à inibição da apresentação antigênica e da produção de citocinas mediante estímulos inflamatórios, leva à utilização destas vacinas na aplicação do controle de vários aspectos da resposta imune, já que, muitas vezes, a

ativação de uma resposta imune específica, apresentação antigênica e citocinas inflamatórias podem levar a processos crônicos e degenerativos. Assim a propriedade anti-inflamatória do DNA em baixas doses pode possibilitar o controle de doenças autoimunes e de inflamações exacerbadas.

Visto os diferentes receptores e moléculas relacionados com a detecção, sinalização e resposta aos estímulos com dsDNA, vê-se necessário o esclarecimento total dos mecanismos moduladores relacionados a estes processos, apesar de grande parte deste assunto estar bem caracterizado frente aos diversos trabalhos publicados na área. Nos últimos anos, tornou-se essencial o esclarecimento dos mecanismos de regulação envolvidos nas vias de sinalização celular, principalmente em resposta ao estímulo ou tratamento por vacinas de DNA. Uma das camadas de regulação mais estudadas recentemente é a regulação pós-transcricional direcionada pelos miRNAs, tornando-se evidente a participação destas moléculas no controle da expressão gênica nos mais variados processos celulares, incluindo desde diferenciação, ativação e sinalização celular, até à participação na indução de doenças autoimunes, alergias e principalmente o câncer.

Tendo em vista todos os aspectos supracitados, este trabalho vem com a proposta de caracterizar e detectar miRNAs relacionados com a regulação da sinalização celular desencadeada pelas vacinas de DNA, dando seguimento aos estudos e trabalhos desenvolvidos no atual grupo de pesquisa deste laboratório. Considerando-se a diferença no perfil da resposta estabelecida por DNA plasmideal em diferentes concentrações (baixa dose e alta dose), é necessário a identificação de miRNAs diferencialmente expressos entre estes estímulos com o objetivo de esclarecer o mecanismo modulador responsável pelas diferentes respostas. Além disso, a predição de genes alvos para estes miRNAs identificados e o estabelecimento de uma relação direta entre miRNA-mRNA possibilita o melhor entendimento do mecanismo como um todo.

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

Identificar o perfil de microRNAs expressos em macrófagos J774 estimulados com DNA plasmideal em alta e baixa doses visando esclarecer o mecanismo imunomodulador da resposta estabelecida.

2.2. Objetivos Específicos

1) Detectar por microarranjo os miRNAs diferencialmente expressos em macrófagos J774 estimulados com DNA plasmideal (10 ou 100 µg/mL) em relação ao grupo controle;

2) Detectar por RT-qPCR a expressão dos miRNAs em modelos de macrófagos estimulados com LPS e tratados com DNA plasmideal;

3) Predizer e caracterizar os genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos, visando inferir o mecanismo de modulação ocorrente na resposta celular frente ao tratamento com baixa dose de DNA plasmideal;

4) Correlacionar a expressão do miRNA e gene alvo e detectar o efeito desta interação na resposta celular.

U/ml de Streptomicina, 1,5 mM de L-glutamina e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

3.3. Animais

Camundongos C57Bl/6 selvagens e *knockout* para a proteína Toll-Like Receptor 9 (TLR9KO), de 4-6 semanas, foram obtidos para a retirada dos macrófagos peritoneais. Foram usados 6 animais WT e 6 animais TLR9KO. Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, 5 mL de solução salina (Cloreto de Sódio 0,9%) gelada foram injetadas na cavidade peritoneal. Após agitação manual, cerca de 3,5 mL do lavado peritoneal de cada animal foram coletados e as células totais foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI completo e a quantidade de 1×10^6 células foi plaqueada em placa de 24 poços. As células foram estimuladas de acordo com os grupos experimentais descritos. Os procedimentos com animais, bem como os protocolos de manipulação e sacrifício, foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Procedimento nº 129/2010) estando, portanto, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.4. Extração do RNA total e avaliação da pureza e integridade

Todo o processo de extração foi realizado com materiais *endofree*, estéreis e autoclavados e durante o procedimento foram usadas luvas de látex sem talco e descartáveis. Foi utilizada, na ressuspensão das amostras, água DEPC autoclavada para garantir que estivesse livre de RNases.

As células estimuladas foram recuperadas e o RNA total foi extraído com TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Para cada poço (1×10^6 células) foi adicionado 700 µL de TRIzol®, após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente foi adicionado 200 µL de clorofórmio. Após vortexar, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente foi feita uma centrifugação a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (límpida) foi coletada e transferida para outro tubo, evitando-se ao máximo a coleta da fase contendo TRIzol® ou contaminantes. O procedimento de adição do clorofórmio, vortexagem,

centrifugação e coleta da fase aquosa, foi repetido uma vez para assegurar melhor descontaminação e pureza das amostras interferindo menos possível no processo de hibridização na lâmina de microarranjo, visto que o fenol impede uma hibridização de alto rendimento. Após este passo, foram acrescentados 500 µL de isopropanol gelado e cada amostra foi vortexada e incubada overnight a -70°C. Posteriormente, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi vertido e adicionado 1 mL 75% de etanol gelado. As amostras foram vortexadas e centrifugadas a 12000g por 5 minutos a 4°C. O sobre nadante foi descartado e as amostras deixadas a temperatura ambiente, secando por 30 minutos. Finalmente, o *pellet* de RNA foi ressuspensão em 20 µL de H₂O e armazenadas a -70°C.

A quantificação das amostras foi realizada no aparelho *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific®). A pureza e integridade das amostras foram verificadas por meio da eletroforese em gel de agarose 1,5% ou da análise no aparelho *BioAnalyser Agilent 2100*. Para as amostras visualizadas por eletroforese em gel de agarose foi realizada a corrente de 80 volts por 1h30 e as bandas de 28S, 18S e 5S de RNA foram visualizadas em transiluminador UV devido à incorporação por brometo de etídio (0,5 µg/mL). Após a constatação da integridade e qualidade do RNA, sem contaminações por DNA ou degradação, o mesmo foi empregado na síntese de cDNA por transcrição reversa. Para as amostras analisadas em aparelho bioanalisador, estas foram dosadas e diluídas para a concentração de 50 ng/µl. As amostras foram preparadas e aplicadas segundo protocolo do fabricante. Após a constatação da integridade e qualidade do RNA, sem contaminações por DNA ou degradação, foram utilizadas aquelas com índice RIN (*RNA Integrity Number*) maior do que 8,0 para o ensaio de microarranjo para microRNAs.

3.5. Ensaio de microarranjo para microRNAs

As lâminas de vidro de *microarray* utilizadas foram obtidas na *Agilent Technologies* (Santa Clara, CA, USA) no formato 8 x 15k, onde quinze mil sondas, referentes aos miRNAs de camundongo, foram preparados e sintetizados *in situ* por meio de um sistema de impressão especializado. O processo de hibridização das amostras foi realizado segundo protocolo *miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling e Hyb Kit®* que acompanha o sistema.

Resumindo, 200 ng de cada amostra de RNA total foram preparados e marcados com fluorocromo (Cianina3-pCp, verde) e colocados sobre a lâmina (8 *arrays* de 15000 *spots* cada). A própria lâmina já contém os devidos controles positivos e negativos. O sistema foi colocado para hibridizar em forno de hibridização, depois desmontado, lavado com diferentes tampões e submetido ao escaneamento em aparelho próprio (*DNA Microarray Scanner with SureScan High-Resolution Technology - Agilent Technologies®*), segundo o fabricante.

A imagem obtida no escaneamento foi utilizada no programa *Agilent Feature Extraction v.10.7* (*Agilent Technologies®*) para conversão dos sinais dos *spots* em valores numéricos. Estes valores foram analisados por meio da plataforma do software *GeneSpring Multi-Omic Analysis GX11.5.1* (*Agilent Technologies®*) onde foi feita a normalização dos valores e a interpretação dos dados. Para isto foi utilizado o modelo de normalização *percentil shift 75* o qual utiliza um padrão de cálculo adequado para o número de *spots* obtidos sem alterar a variância global das amostras fornecendo dados bem representativos quando se usa o *one-color microarray*. A distribuição dos valores de intensidade, para cada miRNA identificado como diferencialmente expresso, foi representada em gráficos *box-whisker*, sempre comparando-se os três grupos experimentais e respeitando a diferença mínima de indução entre os grupos (*fold-change* ≥ 2) e a significância estatística (ANOVA, $p < 0,05$). Além disso, os valores de *fold-change* dos miRNAs diferencialmente expressos foram plotados em um gráfico em barras comparando-se a expressão entre os tratamentos e o grupo controle.

3.6. Síntese de cDNA e dosagem por qPCR

Foi realizada a síntese de cDNA para posterior dosagem da expressão de miRNAs quanto de genes de interesse. Para a dosagem dos controles endógenos snoRNAs e microRNAs, na síntese do cDNA, foi utilizado o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit®* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), sendo utilizados 100 ng de RNA por reação seguindo o protocolo segundo o fabricante. Para isto foram utilizados oligonucleotídeos (*primers*) específicos para transcrição de snoRNAs controles e dos microRNAs previamente identificados. O programa utilizado na reação foi o seguinte: 16°C por 30 minutos, 42°C por 30

minutos e 85°C por 5 minutos no aparelho termociclador *PTC-100™ Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc.).

Para a dosagem dos genes de interesse, na síntese do cDNA, foi utilizado o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit®* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), sendo utilizados 1 µg de RNA por reação seguindo o protocolo segundo o fabricante. Para isto foi utilizado *RT Random Primers* provenientes do *kit* para transcrição e amplificação do RNA total. O programa utilizado na reação foi o seguinte: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos no aparelho termociclador *PTC-100™ Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc.).

Para a dosagem por RT-qPCR dos controles endógenos snoRNAs e dos miRNAs, foi utilizado o *kit Taqman® MicroRNA Assay* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), composto pela sonda específica para cada controle endógeno ou microRNA, 100 ng de cDNA por reação previamente sintetizado mais o *mix* da reação proveniente do produto *Taqman® Universal Master Mix II with UNG* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). O programa utilizado na reação foi o seguinte: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos no aparelho *Rotor-Gene™ 6000* (Corbett Life Science - QIAGEN). Tanto os *primers* para a síntese de cDNA, quanto as sondas específicas para dosagem dos miRNAs via qPCR, foram obtidos junto ao fabricante (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), baseando-se nas sequências descritas nos bancos de dados para cada controle (snoRNA) e microRNA (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências dos controles endógenos e microRNAs usados para a síntese dos *primers* e sondas específicas para a dosagem dos mesmos, por RT-qPCR.

Controles Endógenos	Sequência
snoRNA202	GCUGUACUGACUUGAUGAAAGUACUUUUGAACCCUUUCCAUCUGAUG
snoRNA234	CUUUUGGAACUGAAUCUAAGUGAUUUAAACAAAAUUCGUCACUACCACUGAGA
MicroRNAs	Sequência
mmu-miR-494-3p	UGAAACAUACACGGGAAACCUC
mmu-miR-21-3p	CAACAGCAGUCGAUGGGCUGUC
mmu-miR-1897-5p	CUUUGGAUGGAGAAAGAGGGGG
mmu-miR-1894-3p	GCAAGGGAGAGGGUGAAGGGAG
mmu-miR-294-3p	AAAGUGCUUCCCUUUUGUGUGU

Para a dosagem dos genes de interesse, foi utilizado, em cada reação, 1 µg de cDNA previamente sintetizado, 0,1 µg/µL de cada *primer* (senso e antissenso) e *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) em um volume final de reação de 25 µL. Os genes amplificados, a temperatura de anelamento utilizada e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores usados na reação de RT-qPCR para dosagem dos respectivos genes.

Genes	Sequência do Oligonucleotídeo	Temperatura de Anelamento
β-actina	Senso: AGCTGCGTTTTACACCTTT	58°C
	Antissenso: AAGCCATGCCAATGTTGTCT	
Ifn-α	Senso: GGAAGGTTTCAGGACCAAACAGCCC	59,5°C
	Antissenso: GGGTCATCAGGAAAGCACAGAGCC	
IkBkβ	Senso: TCACGGTAACCGCCTGAGGGA	60°C
	Antissenso: ACCTGAAAACCGCAGGGCCAAC	
Ifn-β	Senso: GCAGCGCGTTGTTGTGCCAT	60°C
	Antissenso: GCGCGAGGTGACGTCGTTGA	

3.7. Predição dos genes alvos

Para os miRNAs considerados diferencialmente expressos foi realizada a predição de genes alvos por meio do banco de dados *online* miRDB, onde todos os alvos foram preditos por meio da ferramenta bioinformática MirTarget2. O miRDB contém genes alvos para miRNAs de várias espécies incluindo camundongo (Wang 2008; Wang e El Naqa 2008).

3.8. Desenho e análise das redes de interações entre microRNA-gene alvo

A partir dos dados obtidos no banco de dados miRDB, referente à predição de genes alvos para os microRNAs diferencialmente expressos, foram geradas, no programa *Cytoscape* v.2.8.0 (<http://www.cytoscape.org/>), redes de interação miRNA-gene alvo, as quais tornam possível a visualização gráfica do compartilhamento de alvos entre os miRNAs identificados. Este programa oferece ferramentas para a integração de dados no gráfico, representação gráfica, seleção e

filtragens, além de uma interface para análises externas por meio de *plugins* (Shannon, Markiel *et al.* 2003).

Baseando-se na biologia de sistemas, o programa reproduz, de forma eficiente, dados provenientes de tabelas ou listas, em forma de redes integrativas, onde moléculas (miRNA, mRNA, proteínas, etc.) são representados por “nós” e as suas interações entre si por ligações ou conexões entre estes nós. Tendo em vista estes pontos, todas as redes apresentadas aqui, são provenientes deste programa.

Para as análises destas redes, foram usados *plugins*, com o objetivo de se extrair ou adicionar informações nestas redes, visando o esclarecimento das perguntas propostas. Os *plugins* usados no presente trabalho foram, o BiNGO v.2.44 (<http://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/Home.html>), e o ClueGO v.1.4 (<http://www.ici.upmc.fr/cluego/>).

3.9. Evidência *in silico* dos sítios de interação microRNA-mRNA

Para a identificação dos sítios de interação entre os miRNAs selecionados e os mRNAs dos genes alvos, foi utilizado o programa *online* de bioinformática *RNAhybrid* v.2.2 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>), que é capaz de calcular a energia livre de hibridização entre um RNA curto (miRNA) e um RNA longo (mRNA) mais favorável para a ligação entre as moléculas, por meio da análise da sequência dos RNAs e da estrutura secundária das mesmas (Rehmsmeier, Steffen *et al.* 2004; Kruger e Rehmsmeier 2006).

Esta metodologia de cálculo é baseada na propriedade termodinâmica da interação miRNA-mRNA, na qual a ligação entre as moléculas é a mais forte e a fita dupla resultante é a mais estável possível. Como resposta, o programa fornece a energia livre mínima da ligação (*mfe – minimum free energy*), o sítio de ligação da molécula de mRNA, além da visualização gráfica da estrutura secundária após a ligação entre as mesmas.

3.10. Detecção da proteína *Phospho-IkB* por *western blot*

Para a detecção e quantificação da proteína *phospho-IkB*, foi realizado o ensaio de *western blot*. Macrófagos J774 foram estimulados e tratados como descrito no Experimento 2 (Figura 5). Após 30 minutos de estímulo, foi realizado o

procedimento para lise da monocamada de células e separação do extrato proteico total. Inicialmente, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X, foram adicionados 100 µL de solução de lise celular (RIPA) mais inibidores de fosfatases e proteases. Após 5 minutos de incubação no gelo, as amostras foram homogeneizadas e transferidas para microtubo. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 14000g por 15 minutos e o sobrenadante foi recuperado e armazenado a -70 °C.

Posteriormente, 20 µL de amostra foram preparados e as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) a 100 V por aproximadamente 2 horas. Foi realizada a separação em 2 géis, um para coloração por *Comassie Blue*, outro para a transferência para membrana de nitrocelulose.

Após o procedimento de separação por SDS-PAGE, foi montado o sistema de transferência das proteínas no gel para membrana de nitrocelulose. O sistema “Esponja-Papel de filtro-Gel-Membrana de nitrocelulose-Papel de filtro-Esponja” foi montado imerso em tampão de transferência 1X. A transferência foi realizada por 1h30 a 100V. A confirmação da transferência foi realizada por coloração com *Ponceau S* por 2 minutos.

Posteriormente foi realizada a marcação das proteínas de interesse. A membrana foi lavada duas vezes com água destilada e incubada em tampão de bloqueio 3% com 5% de Tween[®]-20 (PBS-MLK) por 20 minutos com constante agitação. Após, a membrana foi incubada *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário *Rabbit polyclonal IgG Anti-IkBα* (MILLIPORE) diluído (1:1000) em PBS-MLK. Posteriormente, a membrana foi lavada com água destilada duas vezes e incubada com anticorpo secundário *Goat anti-rabbit IgG* (MILLIPORE), conjugado com HRP, diluído (1:1500) em PBS-MLK por 1h30 em temperatura ambiente e constante agitação. Finalmente, a membrana foi lavada duas vezes com água destilada e incubada com PBS-MLK por 5 minutos.

Após nova lavagem em água destilada, foi utilizado o método de detecção por *DAB-Vector Peroxydase Substrate Kit*. Foi seguido o protocolo segundo o fabricante. Após a revelação, a membrana foi fotografada no aparelho MiniBis Pro 16 mm – Biolmaging Systems (Uniscience) e a quantificação das bandas foi realizada pelo programa *GelQuant Express v.3.1*.

3.11. Análise Estatística

Os cálculos estatísticos para os valores de expressão dos miRNAs, tanto na metodologia de microarranjo quanto na dosagem por RT-qPCR, foram realizados utilizando-se o teste ANOVA, seguido do teste T ou teste de *Tukey* para confirmação, no programa PRISMA. Todos os dados foram realizados em triplicata experimental e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.12. Delineamento Experimental

Experimento 1

Figura 4: Visão geral do delineamento do Experimento 1.

Macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em placa para a obtenção de células suficientes. As células foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O total de 1x10⁶ células/poço foi transferido para placa de 24 poços para realização do ensaio de estímulo com DNA plasmideal. Os três grupos experimentais são: Controle (não estimuladas), Baixa Dose (células estimuladas com 10 µg de pcDNA3 em 1 mL de RPMI completo) e Alta Dose (células estimuladas com 100 µg de pcDNA3 em 1 mL de RPMI completo). Após duas horas de estímulo, o RNA total foi extraído e a pureza e integridade das amostras foram verificadas por meio da análise em aparelho bioanalisador. As amostras foram dosadas no aparelho quantificador. A quantidade de 200 ng de RNA total por amostra foi utilizada para a

caracterização do perfil de miRNAs expressos por meio do ensaio de microarranjo para microRNA. Os dados e valores obtidos na leitura das lâminas foram normalizados e interpretados por programas computacionais. Para os miRNAs identificados como diferencialmente expressos entre as amostras, foi realizada a síntese de cDNA e dosagem por RT-qPCR para confirmar a expressão detectada no microarranjo. Posteriormente foram utilizados programas específicos para predição de genes alvos para cada miRNA detectado para os quais foram analisados as vias e processos biológicos relacionados e estabeleceu-se as respectivas interações entre os miRNAs e os genes alvos, além da confirmação *in silico* da interação entre os dois. Os genes de interesse também foram dosados por RT-qPCR. Todos os grupos experimentais foram conduzidos em triplicata biológica.

Experimento 2

Figura 5: Visão geral do delineamento do Experimento 2.

Macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em placa para a obtenção de células suficientes. O total de 1x10⁶ células/poço foi transferido para placa de 24 poços para realização do ensaio de estímulo com LPS e DNA plasmideal. Os seis grupos experimentais foram: Controle (células não estimuladas), LPS (células estimuladas com 500 ng de LPS em 1 mL de RPMI completo), LPS+Baixa Dose (células estimuladas com 500 ng de LPS em 1 mL de RPMI completo por 2 horas e posteriormente tratadas com 10 µg de pcDNA3 por mais 2 horas), LPS+Alta Dose

(células estimuladas com 500 ng de LPS em 1 mL de RPMI completo por 2 horas e posteriormente tratadas com 100 µg de pcDNA3 por mais 2 horas), LPS/Baixa Dose (células estimuladas ao mesmo tempo com 500 ng de LPS e 10 µg de pcDNA3 por 4 horas) e LPS/Alta Dose (células estimuladas ao mesmo tempo com 500 ng de LPS e 100 µg de pcDNA3 por 4 horas). Após quatro horas de estímulo total, o RNA total foi extraído de todas as amostras e a integridade das mesmas foi verificada por meio da corrida em gel de agarose 1,5%. O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA e dosagem por RT-qPCR dos microRNAs anteriormente detectados no Experimento 1 e dos genes de interesse. Todos os grupos experimentais foram conduzidos em triplicata biológica.

Para o ensaio de *western blot* foram realizados quatro grupos experimentais. Controle (células estimuladas com 1 mL de meio RPMI completo), LPS (células estimuladas com 500 ng de LPS em 1 mL de RPMI completo), LPS/Baixa Dose (células estimuladas ao mesmo tempo com 500 ng de LPS e 10 µg de pcDNA3) e LPS/Alta Dose (células estimuladas ao mesmo tempo com 500 ng de LPS e 100 µg de pcDNA3). Após 30 minutos, foi obtido o extrato proteico total e realizado o ensaio de *western blot*. Todos os grupos experimentais foram conduzidos em triplicata biológica.

Experimento 3

Figura 6: Visão geral do delineamento do Experimento 3.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 selvagens (WT) e *knockout* (KO) para o receptor TLR9 (TLR9KO) foram obtidos através do lavado peritoneal com salina gelada. Foram injetados cerca de 5 mL de salina gelada, e retirados aproximadamente 3,5 mL do lavado. A quantidade de 1×10^6 células totais/poço foi transferida para placa de 24 poços para realização do ensaio de estímulo com DNA plasmideal. Os três grupos experimentais foram os mesmos descritos no Experimento 1 (Controle, Baixa Dose e Alta Dose) tanto para os camundongos WT quanto *knockout*. Após duas horas de estímulo, o RNA total foi extraído e a integridade das amostras foi verificada por meio da corrida em gel de agarose 1,5%. O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA e dosagem por RT-qPCR dos miRNAs identificados. Todos os grupos experimentais foram conduzidos em triplicata biológica.

4. Resultados

4.1. Extração do RNA total e verificação da integridade

De acordo com o Experimento 1, a quantidade de 1×10^6 células de macrófagos da linhagem J774 foi estimulada segundo os grupos experimentais previamente descritos (Controle, Baixa Dose e Alta Dose). Após duas horas o RNA total foi extraído com TRIzol®, as amostras foram quantificadas e a qualidade e integridade das amostras foi verificada em aparelho bioanalisador. O índice de integridade das amostras ou RIN (*RNA Integrity Number*) foi satisfatório para todas as amostras visto que a qualidade é considerada ótima com RIN acima de 8,0 (Schroeder, Mueller *et al.* 2006) (Figura 7). Estas amostras foram posteriormente utilizadas no ensaio de microarranjo para caracterização do perfil dos miRNAs expressos, além da dosagem de miRNAs e genes por RT-qPCR.

Figura 7: Figura Superior: foto do gel obtido da análise das amostras de RNA total em aparelho bioanalisador. Figura Inferior: Densitometria da eletroforese em gel das amostras de RNA total obtidas, mostrando os respectivos picos das frações de rRNA 28S, 18S e 5S.

P: padrão molecular; Amostras 1-3: Controle, Amostras 4-6: Baixa Dose, Amostras 7-9: Alta Dose. À direita o índice RIN fornecido pelo aparelho correspondente à qualidade e integridade das amostras.

De acordo com o Experimento 2, foi realizado o procedimento de estímulo e extração de RNA total de macrófagos da linhagem J774 segundo os grupos experimentais descritos. As amostras foram quantificadas e a qualidade e integridade foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 8). Estas amostras foram usadas para a dosagem por RT-qPCR dos miRNAs miR-494-3p, miR-21-3p, miR-294-3p e dos genes de interesse.

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificação da qualidade das amostras extraídas. Amostras 1-3: Controle, Amostras 4-6: LPS, Amostras 7-9: LPS + Baixa Dose, Amostras 10-12: LPS + Alta Dose, Amostras 13-14: LPS/Baixa Dose, Amostras 15-16: LPS/Alta Dose. As bandas de RNA foram marcadas com brometo de etídeo e visualizadas sob luz ultravioleta.

De acordo com o Experimento 3, o mesmo procedimento de estímulo e extração de RNA total foi realizado para os macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 selvagem (WT) e *knockout* para o receptor TLR9 (TLR9KO). As amostras foram quantificadas e a qualidade e integridade foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 9). Estas amostras foram usadas para a dosagem por RT-qPCR dos miRNAs de interesse.

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificação da qualidade das amostras extraídas. Amostras 1-3: TLRKO Controle, Amostras 4-6: TLR9KO Baixa Dose, Amostras 7-9: TLR9KO Alta Dose, Amostras 10-12: WT Controle, Amostras 13-15: WT Baixa Dose, Amostras 16-18: WT Alta Dose. As bandas de RNA foram marcadas com brometo de etídeo e visualizadas sob luz ultravioleta.

4.2. Detecção dos microRNAs por microarranjo e quantificação da expressão

Conforme descrito no Experimento 1, as amostras de RNA total obtidos dos grupos experimentais descritos foram utilizadas no ensaio de microarranjo para caracterização do perfil dos miRNAs diferencialmente expressos entre os tratamentos. Os sinais obtidos pelo *scanner* foram normalizados e convertidos em valores de expressão. Abaixo está representado o perfil de expressão dos miRNAs identificados no ensaio de microarranjo, sendo que no total foram identificados 199 miRNAs expressos entre as amostras (Figura 10-A) entretanto somente 6 microRNAs (miR-494-3p, miR-21-3p, miR-1897-5p, miR-1894-3p, miR-483-5p e miR-294-3p) foram considerados como diferencialmente expressos respeitando a indução mínima de pelos menos 2 vezes de diferença entre os tratamentos (*fold-change* ≥ 2) e considerados significativamente diferentes pelo teste estatístico utilizado (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 10-B).

Para os miRNAs diferencialmente expressos foi obtido os valores de expressão em cada tratamento referentes ao sinal obtido na hibridização. (Figura 11). O miR-494-3p foi mais expresso no tratamento com baixa dose de DNA plasmideal. O miR-21-3p apresentou maior expressão nos dois tratamentos em relação ao controle. O outros miRNAs (miR-1897-5p, miR-1894-3p, miR-483-5p e miR-294-3p) apresentaram maior expressão no tratamento com alta dose de DNA plasmideal (Figura 11).

Figura 10: Perfil de expressão dos microRNAs detectados. (A) Total de 199 miRNAs identificados e (B) 6 microRNAs diferencialmente expressos entre os tratamentos. Os valores estão representados na escala log2.

Figura 11: Expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre os tratamentos (fold-change $\geq 2,0$; *ANOVA $p < 0,05$). Os valores estão representados na escala log2.

Os miRNAs são classificados como diferencialmente expressos quando apresentam entre dois tratamentos uma indução de pelos menos duas vezes de diferença entre os valores de expressão. Este valor chamado de *fold-change* representa a razão do valor de expressão de um miRNA de um tratamento sobre o valor de expressão do mesmo miRNA em outro tratamento. O gráfico abaixo representa os valores de *fold-change* dos tratamentos (Baixa Dose e Alta Dose) em relação ao Controle (Figura 12), referente aos resultados do ensaio de microarranjo. O miR-494-3p está induzido somente no tratamento Baixa Dose. O miR-21-3p está induzido nos dois tratamentos (Baixa Dose e Alta Dose) em relação ao grupo Controle e os miRNAs miR-1897-5p, miR-483-5p, miR-1894-3p e miR-294-3p estão somente induzidos no tratamento Alta Dose.

Figura 12: Representação do *fold-change* da expressão dos miRNAs dos grupos tratamentos em relação ao controle. Foram considerados miRNAs diferencialmente expressos aqueles que apresentam *fold-change* $\geq 2,0$ em pelo menos uma das comparações.

4.3. Detecção da expressão dos microRNAs por RT-qPCR

Dos seis miRNAs diferencialmente expressos nas amostras do Experimento 1, foi detectada, por meio da RT-qPCR, a expressão de três deles (miR-494-3p, miR-21-3p e miR-294-3p) (Figura 13). Os microRNAs miR-1897-5p e miR-1894-3p não

foram detectados pela técnica, haja vista a não amplificação dos miRNAs. O miR-483-5p não possuía os *primers* e sondas específicos para a compra junto ao fabricante e por isso não foi avaliado por esta técnica. Para os miRNAs detectados, os valores de expressão entre os tratamentos não foram considerados significativamente diferentes pelo teste estatístico utilizado (ANOVA). Apesar do resultado observado abaixo indicar a mesma tendência do resultado obtido no experimento de *microarray* (Figura 12) é necessária a reprodução do experimento para se obter um menor desvio padrão entre as amostras.

Figura 13: Detecção dos miRNAs diferencialmente expressos por RT-qPCR.

Os mesmos miRNAs detectados acima tiveram suas expressões dosadas nas amostras do experimento 2, onde macrófagos da linhagem J774 foram estimulados ou não com LPS e tratados com dsDNA em diferentes concentrações (Figura 5). O miR-494-3p teve sua expressão diminuída em relação ao controle nos grupos LPS, LPS + Alta Dose e LPS/Alta Dose, porém sua expressão foi restaurada quando as células foram tratadas com baixa dose de pcDNA3 após o estímulo de LPS. O miR-294-3p teve sua expressão aumentada em relação ao controle apenas no tratamento com LPS e teve sua expressão restaurada nos grupos LPS + Alta Dose e LPS/Alta Dose. O miR-21-3p teve sua expressão aumentada em relação, ao grupo controle, nos grupos LPS, LPS + Alta Dose e LPS/Alta Dose, porém sua expressão foi restaurada ao normal nos grupos LPS + Baixa Dose e LPS/Baixa Dose (Figura 14).

Figura 14: Dosagem dos miRNAs por RT-qPCR. Foram dosados os miRNAs miR-494-3p, miR-294-3p e miR-21-3p, nas amostras dos grupos do Experimento 2. *ANOVA ($p<0,05$), seguido de teste T, foi utilizado para confirmar a significância estatística.

O miR-494-3p foi também dosado em células de camundongos selvagem e *knockout* para o receptor TLR9. Como podemos observar, a expressão do miRNA nos camundongos WT (selvagem) foi similar ao resultado obtido no experimento 1, tanto para o tratamento com baixa dose de dsDNA quanto alta dose, entretanto, em camundongos *knockout* houve uma aumento significativo da expressão deste miRNA no tratamento com alta dose de pcDNA3 (Figura 15).

Figura 15: Dosagem do miR-494-3p por RT-qPCR nas amostras do Experimento 3. *ANOVA ($p < 0,05$), seguido de teste T, foi utilizado para confirmar significância estatística.

4.4. Predição dos genes alvos

Para os miRNAs identificados como diferencialmente expressos (Figura 10) foi feita a predição de genes alvos por meio do banco de dados *online* miRDB. O gráfico abaixo representa a quantidade de genes alvos preditos para cada miRNA (Figura 16). Para os miRNAs miR-494-3p, miR-21-3p, miR-1894-3p, miR-1897-5p, miR-294-3p e miR-483-5p foram preditos, respectivamente, 506, 709, 241, 349, 441 e 22 genes alvos pelo programa escolhido.

Figura 16: Número de genes alvos preditos para cada microRNA por meio do banco de dados miRDB (Wang 2008; Wang e El Naqa 2008).

4.5. Análise e caracterização dos genes alvos candidatos

A partir dos dados obtidos por meio da predição computacional, foi feita uma lista, no programa *Cytoscape* (Shannon, Markiel *et al.* 2003; Smoot, Ono *et al.* 2011), contendo todos os 6 microRNAs detectados no *microarray* e seus respectivos 2061 genes alvos.

Posteriormente, foi realizada a caracterização dos processos celulares mais enriquecidos nesta lista de genes. Esta caracterização foi realizada através da discriminação dos genes em categorias de *Gene Ontology* (GO) (Ashburner, Ball *et al.* 2000), descrição utilizada para padronizar a representação de uma lista de genes, através de vocabulários e termos que descrevem determinada característica, como função molecular, componente celular ou processo biológico. Para isso, foi utilizado, por meio do programa *Cytoscape*, o *plugin* BiNGO (Maere, Heymans *et al.* 2005), uma ferramenta usada para determinar quais categorias de GO estão mais representadas estatisticamente em determinado grupo de genes ou rede biológica, que além de mapear todos os termos mais relevantes e listar os genes envolvidos em cada um respectivamente, fornece uma rede no *Cytoscape* correlacionando todos os termos citados. A partir desta rede, é possível selecionar os processos biológicos de interesse, e consequentemente os genes envolvidos, sendo possível formar uma nova lista contendo somente os genes alvos referentes aos processos celulares relevantes ao presente estudo.

Na figura 17, é possível visualizar o mapa das categorias de GO referente aos processos biológicos em que os 2061 genes preditos estão envolvidos. Analisando-se o mapa dos GO's e a lista das categorias obtidas pelo programa, foram selecionados aqueles termos mais relevantes para a análise dos genes envolvidos nos mecanismos e processos referentes ao assunto discutido na presente dissertação. Os termos selecionados e os genes correspondentes a cada classificação estão listados na Tabela 3. Esta tabela contém, além dos termos das categorias, o número de genes envolvidos, o valor P corrigido de significância gerado pelo próprio programa e a relação de genes em cada categoria. Ao todo, foram filtrados 788 genes distribuídos e compartilhados entre as 18 categorias selecionadas por meio das quais foi gerada uma nova lista de genes e uma nova rede integrativa entre os miRNAs e os respectivos alvos (Figura 18).

Figura 17: Mapa integrativo dos processos biológicos (GO) mais enriquecidos da lista total de genes alvos, gerado pelo *plugin* BiNGO, presente no Cytoscape. Quanto maior o “nó” na rede, maior a quantidade de genes pertencentes ao respectivo processo biológico, e a cor indica a significância estatística ($p < 0,01$).

Tabela 3: Categorias de GO dos processos biológicos obtidos pelo *plugin* BiNGO (*Cytoscape*). Aqui, só estão representados os termos escolhidos para posteriores análises.

GO	Termo	P Valor Corrigido	Frequência de Genes/Cluster	Genes
10468	regulação da expressão gênica	1,35E-43	325/1880 17.2%	MEF2C NAA15 RORB MYLIP MXI1 RFXAP CTNNB1 PGR ZFP92 ZFP91 ZFP93 GBF1 TRAK2 SERPINE2 MED28 WDR77 PHTF1 TIGD4 PITX2 CCAR1 PHOX2B IKBKAP HMG20A GEM MECOM ZFP827 PRDM8 MTF1 PRDM4 CAMK4 PIAS3 ZFP280D MNT EIF2C3 IRAK1BP1 CRTC2 IGF2BP1 AHCTF1 VIT TRP53BP1 TCF20 MOV10 IL17A PBRM1 NKX2-1 LHX6 LHX8 TRAM1 NKRF PLAG1 ASXL2 KLF6 ASXL3 TCF7 KLF8 KLF13 ZBTB41 ESRRG SMYD1 SMAD2 EN2 UBP1 GCFC1 NOTCH1 RNF6 ZFHx4 SAP130 DCP1A TRPS1 ZFP740 JAZF1 HOPX ZFP800 RAD54B RAD54L2 CHAF1A ZFHx3 KLF4 ENY2 HLF GM98 ZFP46 CPEB2 EVX1 FOXA2 ELF4 FGF9 ZFP42 TBX20 GLI3 PTEN MBTD1 DYNLL1 HIF1AN TRMT6 ANP32A ZFP238 FGF1 TOP2A SERTAD2 ZFP422 RBBP5 MYCS TLE4 GTF2H3 FOSB RBBP7 GTF2H2 GTF2H1 QK TAF11 ZSCAN10 CAND1 RBM39 TBX18 CLOCK SERP1 ALOX12 ZFP62 LCORL CREM EHF NEO1 SEC14L2 MYCL1 PHIP NR1D2 BCL11B RB1CC1 PPP3CB ETV1 BCL6 HBP1 MYSM1 FOXD4 BRMS1L MYSM1 MLLT3 FOXD3 JARID2 IL7 ZFP1 IGF1 ZFP2 WWTR1 CCNB1 PKNOX2 RP56KA5 CSNK1D BNC1 WHSC1L1 ZBTB5 PBX3 NR5A2 APBB2 NEUROD6 TOB2 NCBP2 THRB CCDC85B LMO3 EIF5 CASK ZXDB FOXO4 CNOT7 GTF2E1 MYOCD CGGBP1 MIER1 DDX25 TARDBP HOXC4 ZFP507 ATF6B MIER3 TRP63 PUM1 ZFP503 OLIG2 MLL3 TGS1 MLL1 DNAJC1 MLL2 MYST3 MBD3L1 A930001N09RIK ARNTL SIX6 ZFP697 SMARCA5 MGA PAF1 MYNN ZFP512 ME1 FGFR2 EID1 FGFR1 CAMTA1 HMGGB1 TSHZ3 HMGGB2 TFAP4 ONECUT2 SOX5 KEAP1 NR2C2 ATF1 MED12L IRAK4 MEIS2 ELK4 HOXA5 JUND ASF1A TAF1 ZMYM2 CREBZF WDR5 JRKL BRIP1 WHSC1 2210012G02RIK ZFP148 ATF7IP2 BRCA1 ARID3C ATP7A SALL2 ATF3 EBF4 HOXB7 EBF2 IKBKG SMARCC2 CIRBP TMPO IKBKB HDAC9 PDCD7 EIF4E2 BMI1 E2F2 E2F3 E2F7 ARID4B DICER1 NR6A1 PAX6 PRRX1 ZKSCAN1 CBAF2T3 HDX ZFP641 TMF1 FUBP1 DGCR8 PRMT6 RHOA ALX1 ELP4 PRKCA ELP3 SSBP2 RUNX1T1 NCOAT UBE2I IRF2BP2 MBNL1 FOXJ3 LPIN2 LPIN1 UBE2B MIXL1 PURB PRKCB MYT1L EYA1 BTG2 NCOA3 FAM120B NCOA5 ZFPM2 JMJD1C ZFP367 ZFP161 C1D BCLAF1 NR3C1 PRDM16 ARID2 CCDC59 TSC22D1 CHD9 HIC2 RGM8 NPAS3 ZFP191 TRDMT1 POU2F3 MAP3K1 CHD1 MLXIP POU3F2 TNRC6B TEX261 SCO1 TXNIP KAT2B CREB1 HMBBOX1 SOX30 VSX1 IRF9 JHDM1D ATXN3 ZBED6 ZFP182 DR1 GRLF1 MAPK8IP3 IRF2 ZFP536 NFIB
45449	regulação da transcrição	7,17E-39	290/1880 15.4%	MEF2C NAA15 RORB MXI1 RFXAP CTNNB1 PGR ZFP92 ZFP91 ZFP93 GBF1 TRAK2 MED28 WDR77 PHTF1 TIGD4 PITX2 CCAR1 PHOX2B IKBKAP HMG20A GEM MECOM ZFP827 PRDM8 CAMK4 PRDM4 MTF1 PIAS3 ZFP280D MNT IRAK1BP1 CRTC2 AHCTF1 VIT TRP53BP1 IL17A TCF20 PBRM1 NKX2-1 LHX6 LHX8 TRAM1 PLAG1 ASXL2 NKRF KLF6 ASXL3 TCF7 KLF8 KLF13 ZBTB41 ESRRG SMYD1 SMAD2 EN2 UBP1 GCFC1 NOTCH1 RNF6 ZFHx4 SAP130 DCP1A TRPS1 ZFP740 JAZF1 HOPX ZFP800 RAD54B RAD54L2 CHAF1A ZFHx3 KLF4 ENY2 HLF GM98 ZFP46 EVX1 FOXA2 ELF4 ZFP42 TBX20 GLI3 MBTD1 DYNLL1 HIF1AN ANP32A ZFP238 FGF1 TOP2A SERTAD2 ZFP422 RBBP5 MYCS TLE4 GTF2H3 FOSB RBBP7 GTF2H2 GTF2H1 TAF11 ZSCAN10 CAND1 RBM39 TBX18 CLOCK ZFP62 LCORL CREM EHF NEO1 SEC14L2 MYCL1 PHIP NR1D2 BCL11B RB1CC1 ETV1 BCL6 HBP1 MYSM1 FOXD4 BRMS1L MLLT3 FOXD3 JARID2 ZFP1 IGF1 ZFP2 WWTR1 RP56KA5 PKNOX2 BNC1 WHSC1L1 ZBTB5 PBX3 NR5A2 APBB2 NEUROD6 THRB CCDC85B LMO3 CASK ZXDB CNOT7 FOXO4 GTF2E1 MYOCD CGGBP1 MIER1 TARDBP HOXC4 ZFP507 MIER3 ATF6B TRP63 ZFP503 OLIG2 MLL3 TGS1 MLL1 MLL2 MYST3 MBD3L1 A930001N09RIK ARNTL SIX6 ZFP697 SMARCA5 MGA PAF1 MYNN ZFP512 FGFR2 ME1 EID1 CAMTA1 HMGGB1 TSHZ3 HMGGB2 TFAP4 ONECUT2 SOX5 KEAP1 NR2C2 ATF1 MED12L IRAK4 MEIS2 ELK4 HOXA5 JUND ASF1A TAF1 ZMYM2 CREBZF WDR5 JRKL BRIP1 WHSC1 2210012G02RIK ZFP148 ATF7IP2 ARID3C SALL2 ATF3 HOXB7 EBF4 EBF2 SMARCC2 IKBKG TMPO HDAC9 IKBKB PDCD7 BMI1 E2F2 E2F3 E2F7 ARID4B NR6A1 PAX6 PRRX1 ZKSCAN1 CBAF2T3 HDX ZFP641 TMF1 FUBP1 PRMT6 RHOA ALX1 ELP4 ELP3 SSBP2 RUNX1T1 NCOAT UBE2I IRF2BP2 FOXJ3 LPIN2 LPIN1 UBE2B MIXL1 PURB PRKCB MYT1L EYA1 BTG2 NCOA3 FAM120B NCOA5 ZFPM2 JMJD1C ZFP367 ZFP161 C1D BCLAF1 NR3C1 PRDM16 ARID2 CCDC59 TSC22D1 CHD9 HIC2 RGM8 NPAS3 ZFP191 POU2F3 MAP3K1 CHD1 MLXIP POU3F2 TEX261 TXNIP KAT2B CREB1 HMBBOX1 SOX30 VSX1 IRF9 JHDM1D ATXN3 ZBED6 ZFP182 DR1 GRLF1 IRF2 ZFP536 NFIB
10467	expressão gênica	3,58E-36	312/1880 16.5%	MEF2C 2610101N10RIK NAA15 SYNCRIP RORB MXI1 WTAP CTNNB1 PGR ZFP92 ZFP91 ZFP93 MED28 PHTF1 DYNC2H1 PTBP2 LUC7L3 CCAR1 IKBKAP YARS HMG20A MECOM ZFP827 PRDM8 PRDM4 MTF1 PIAS3 ZFP280D MNT MRPL48 IRAK1BP1 CRTC2 PUS3 AHCTF1 WARS2 VIT HNRNPA3 TRP53BP1 TCF20 PBRM1 NKX2-1 LHX6 LHX8 TRAM1 UTP23 NKRF PLAG1 ASXL2 KLF6 ASXL3 TCF7 KLF8 KLF13 ZBTB41 ESRRG SMYD1 SMAD2 HNRNPA1 UBP1 GCFC1 SRSF2 NOTCH1 ZFHx4 2310079F23RIK SAP130 SRSF7 ZFP740 JAZF1 HOPX ZFP800 RAD54B CHAF1A ZFHx3 KLF4 ENY2 SRSF1 HLF GM98 ZFP46 FOXA2 ELF4 ZFP42 TBX20 UTP15 GLI3 RNGTT MBTD1 DYNLL1 RRP18 HIF1AN TRMT6 ANP32A ZFP238 TWISTNB SERTAD2 ZFP422 RBBP5 EXOSC4 TLE4 GTF2H3 EIF1B FOSB EIF1A RBBP7 GTF2H2 GTF2H1 QK TAF11 ZSCAN10 CAND1 SNRNP40 RBM39 THOC2 AARS2 TBX18 CLOCK PRPF38B ZFP62 LCORL CREM EHF SEC14L2 RPP14 CYLD SF3B1 NR1D2 BCL11B RB1CC1 MRPL19 ETV1 BCL6 HBP1 RBM27 MYSM1 BRMS1L FOXD4 MLLT3 FOXD3 RBM22 POLR3G POLR3F JARID2 ZFP1 ZFP2 WWTR1 PRPF18 SF3A1 PAPOLA BNC1 WHSC1L1 ZBTB5 PBX3 NR5A2 NEUROD6 NCBP2 PRPF4B THRB CCDC85B LMO3 APOBEC4 EIF5 ZXDB CNOT7 FOXO4 GTF2E1 MYOCD CGGBP1 MIER1 TARDBP HOXC4 ZFP507 MIER3 ATF6B TRP63 EIF1 ZFP503 OLIG2 MLL3 TGS1 MLL1 MLL2 MYST3 MBD3L1 ARNTL ZFP697 CELF2 MGA PAF1 MYNN 1110037F02RIK ZFP512 ME1 EID1 CAMTA1 TSHZ3 MRPS14 ONECUT2 SOX5 KEAP1 PTRH2 ATF1 NR2C2 MED12L HNRNPL GFM2 HNRNPK CNOT6L HOXA5 JUND MBNL3 HNRNPC ASF1A NOVA1 SRGN TAF1 ZMYM2 CREBZF WDR5 WHSC1 2210012G02RIK ZFP148 ATF7IP2 ARID3C TRNT1 SALL2 ATF3 HOXB7 EBF4 EBF2 SMARCC2 IKBKG HDAC9 PDCD7 EIF4E2 DDX51 BMI1 E2F2 E2F3 E2F7 ARID4B DICER1 NR6A1 PAX6 ZKSCAN1 CBAF2T3 ZFP641 TMF1 FUBP1 DGCR8 PRMT6 ELP4 ELP3 SSBP2 RUNX1T1 NCOAT MBNL1 FOXJ3 LPIN2 LPA1 MIXL1 PURB PRKCB MYT1L EYA1 BTG2 NCOA3 FAM120B NCOA5 ZFPM2 JMJD1C IFT88 ZFP367 ZFP161 C1D BCLAF1 TRA2B TRA2A NR3C1 PRDM16 CCDC59 ZFP221 DIMT1 CHD9 HIC2 NPAS3 A1CF ZFP191 POU2F3 TRDMT1 CHD1 MLXIP POU3F2 NSUN2 TEX261 TXNIP KAT2B ADARB1 CREB1 HMBBOX1 SOX30 VSX1 IRF9 JHDM1D ATXN3 ZBED6 ZFP182 DR1 CASP12 GRLF1 IRF2 ZFP536 NFIB

					MEF2C NAA15 RORB MX1 CTNNB1 PGR ZFP92 ZFP91 ZFP93 MED28 PHTF1 CCAR1 IKBKAP HMG20A MECOM ZFP827 PRDM8 PRDM4 MTF1 PIA53 ZFP280D MNT IRAK1BP1 CRTC2 AHCTF1 VIT TRP53BP1 TCF20 PBRM1 NKX2-1 LHX6 LHX8 TRAM1 PLAG1 ASXL2 NKRF ASXL3 KLF6 TCF7 KLF8 KLF13 ESRRG ZBTB41 SMYD1 SMAD2 UBP1 GCFC1 NOTCH1 ZFH4 SAP130 ZFP740 JAZF1 HOPX ZFP800 RAD54B CHAF1A ZFH3 KLF4 ENY2 HLF GM98 ZFP46 FOXA2 ELF4 ZFP42 TBX20 GLI3 MBTD1 HIF1AN DYNLL1 ANP32A ZFP238 TWISTNB SERTAD2 ZFP422 RBBP5 TLE4 GTF2H3 FOSB RBBP7 GTF2H2 GTF2H1 TAF11 ZSCAN10 CAND1 RBM39 TBX18 CLOCK ZFP62 LCORL CREM EHF SEC14L2 NR1D2 BCL11B RB1CC1 ETV1 HBP1 BCL6 MYSM1 FOXD4 BRMS1L FOXD3 MLLT3 POLR3G POLR3F JARID2 ZFP1 ZFP2 WWTR1 PAPOLA WHSC1L1 BNC1 ZBTB5 PBX3 NR5A2 NEUROD6 THRB CCDC85B LMO3 ZXDB CNOT7 FOXO4 GTF2E1 MYOCD CGGBP1 MIER1 TARDBP HOXC4 ZFP507 MIER3 ATF6B TRP63 ZFP503 OLIG2 MLL3 TGS1 MLL1 MLL2 MYST3 MBD3L1 ARNTL ZFP697 MGA PAF1 MYNN ZFP512 ME1 EID1 CAMTA1 TSHZ3 ONECUT2 SOX5 KEAP1 NR2C2 ATF1 MED12L HOXA5 JUND ASF1A TAF1 ZMYM2 CREBZF WDR5 WHSC1 ZFP148 2210012G02RIK ATF71P2 ARID3C SALL2 ATF3 HOXB7 EBF4 EBF2 SMARCC2 IKBKG HDAC9 BMI1 E2F2 E2F3 E2F7 ARID4B NR6A1 PAX6 ZKSCAN1 CBFA2T3 ZFP641 TMF1 FUBP1 PRMT6 ELP4 ELP3 SSBP2 RUNX1T1 NCOA7 FOXJ3 LPIN2 LPIN1 PURB MIXL1 PRKCB MYT1L EYA1 BTG2 NCOA3 FAM120B NCOA5 ZFPM2 JMJD1C ZFP161 ZFP367 C1D BCLAF1 NR3C1 PRDM16 CCDC59 TSC22D1 CHD9 HIC2 NPAS3 ZFP191 POU2F3 CHD1 MLXP POU3F2 TEX261 TXNIP KAT2B CREB1 HMBBOX1 SOX30 VSX1 IRF9 JHDM1D ATXN3 ZBED6 ZFP182 DR1 GRLF1 IRF2 ZFP536 NFIB
6350	transcrição	7,55E-36	242/1880 12.8%		MEF2C THRB CASK RORB MX1 FOXO4 CNOT7 CTNNB1 ZFP92 PGR ZFP93 MYOCD TRAK2 HOXC4 WDR77 ATF6B TRP63 OLIG2 MLL3 MLL1 PITX2 MBD3L1 PHOX2B A930001N09RIK GEM ARNTL MECOM SIX6 MTF1 MNT SMARCA5 MGA ME1 FGFR2 EID1 HMGB1 TSHZ3 HMG82 TFAP4 ONECUT2 SOX5 VIT NR2C2 ATF1 MED12L IRAK4 TRP53BP1 TCF20 IL17A MEIS2 ELKA HOXA5 JUND NKX2-1 LHX6 LHX8 TRAM1 KLF6 TAF1 TCF7 CREBZF KLF13 ESRRG BRIP1 WHSC1 SMAD2 EN2 2210012G02RIK ZFP148 SALL2 NOTCH1 RNF6 ZFH4 ATF3 EBF4 HOXB7 EBF2 TRPS1 JAZF1 HOPX HDAC9 ZFH3 KLF4 PDCD7 BMI1 E2F2 HLF GM98 E2F3 ZFP46 EVX1 FOXA2 ELF4 E2F7 TBX20 NR6A1 PAX6 PRRX1 ZKSCAN1 CBFA2T3 HDX GLI3 ZFP641 RHOA ZFP238 FGF1 TOP2A SERTAD2 ALX1 ELP4 MYCS RUNX1T1 TLE4 GTF2H3 UBE2I IRF2BP2 FOXJ3 FOSB LPIN2 RBBP7 LPIN1 UBE2B MIXL1 PURB MYT1L ZSCAN10 NCOA3 CAND1 ZFPM2 TBX18 ZFP367 CLOCK CREM EHF NR3C1 ARID2 TSC22D1 MYCL1 NPAS3 ZFP191 NR1D2 POU2F3 MAP3K1 BCL11B ETV1 BCL6 POU3F2 FOXD4 MLLT3 FOXD3 TXNIP KAT2B JARID2 CREB1 HMBBOX1 ZFP1 IGF1 WWTR1 VSX1 IRF9 PKNXO2 RPS6KA5 JHDM1D ZBED6 ZFP182 IRF2 PBX3 NR5A2 NFIB
6355	regulação da transcrição dependente de DNA	2,49E-20	169/1880 8.9%		RP1 RAB9B IL6ST TNFSF15 LPAR3 FGF13 FOXO4 ITSN1 RGL1 PGR 5730403B10RIK TIAM2 B230120H23RIK TRP63 PIK3CA RALA RAPGEF4 MLL3 FR52 MAP2K6 IKBKAP MAGI2 ROCK1 BRAF SOCS2 GEM SOCS5 SYNJ2BP STK4 TANK ASB8 RND1 RASGRF2 CAR8 PDGFRB ARL8B STMN1 UNC13B IRAK1BP1 KALRN CNIH PTPLAD1 CDC42SE1 DCCD2A CCNG1 ARFGEF2 IRAK4 RHOBTB2 ADRA2B FGD4 RAB8A MAP2K3 SMAD2 RAB7L1 ATM BRCA1 RAB33B RAB1 ARF4 IKBKG RAP1B RGS9 IKBKB SYNJ1 PREX2 RHOQ EDNRB NISCH RHOA GUCY1A3 RHOC CALCRL RAB6A FGF1 AGAP1 ERRF1 ARL5B RHOH SHC4 PRKCA ARHGEF4 RAP2B RAP2A CCDC88A PIK3C2B PRKCI ARHGAP29 GRM1 PRKCB ARHGAP31 DOK3 GRM8 GRM7 DEF8 RAB5A NKIRAS1 SERP1 ARL4A RAB3C NR3C1 RAB43 SORBS2 DNGK RB1CC1 MAP3K1 PIKFYVE CYP26B1 RAB11A BCL6 RASA3 SCO1 FZD2 NPR3 RCAN3 GSG2 RALGDS RASL11B LEP RPS6KA5 ICK PRLR CASP12 RAB22A YWHAQ JAK1 MAPK8IP3 RAB38
23034	via de sinalização intracelular	3,17E-15	127/1880 6.7%		RP1 JUB PTGS2 PTGS1 SNCA RORB MYLIP CTNNB1 PGR ATP2B2 BDNF INSIG2 SERPINE2 CYP7A1 SERPINE1 POLK BRAF COLEC10 LIG3 UBR3 LIG4 MECOM CLEC4N CTNNA2 DCLRE1C MTF1 F3 CX3CR1 ABAT PTPLAD1 ACP2 OBFC2A MANF TRP53BP1 IL17A NKX2-1 POLQ LHX8 MAP2K3 TGFB2 TRPC7 PCDH15 SMAD2 AFG3L2 ATM NTRK2 TMOD2 RAD54B RGS9 STXB3A CHAF1A GHSR KLF4 HLF FOXA2 TOLLIP ZMAT3 SYNJ1 SUSD2 SOBP LATS1 PTEN EDNRB IL1RAP GUCY1A3 NSMCE2 SEMA3A ERRF1 FANCC RBBP5 GEN1 GTF2H3 GRM1 GTF2H2 GPR98 GTF2H1 IL20RB XPR1 GRM8 GRM7 ADAM17 IL12B CLN8 CHL1 CLN6 ALOX12 SERP1 MYO5A MFS9D AB12 FKBP1A IL7R NETO1 PHIP SORBS1 PDE1C MDC1 RB1CC1 PPP3CB TRP53INP1 ETV1 FASL BCL6 CLEC2H SNAP25 POLR3G SELP POLR3F SLC8A1 IL7 ATRN CTLA4 AXL IGF1 IGF2 BNC1 USP46 DPYD PBX3 LRP2 VLDLR THRB HMGCR GRIK2 BTRC TNFSF15 ILDR2 FOXO4 CALB1 CXCL12 KLHL1 5730403B10RIK MYOCD ATG5 PAPP4 ATF6B TRP63 PRKCA SPON2 LNP DTL USP1 THBD LRAT PI4K2A SMARCA5 VAMP2 SRXN1 CROT FGFR2 ME1 HMGB1 HMGB2 DERL2 IFIH1 TFAP4 CYSLTR1 6330512M04RIK RRM2B CCNG1 TTCS GCLM IKBIP IRAK4 ITGB6 ADRA2A STRBP RAD51L3 ASF1A PGGT1B DNAAJ2 FGD4 SHPRH PTPN2 GABRA5 BRCA1 ATP7A TNFSF10 CDKN1A UCP3 SLC7A2 GLS CIRBP ADAM22 CACNA1C HDAC9 CACNA1A PDCD7 BMI1 SLC45A2 GM2A CDC14B ALG2 DICER1 ACOT2 RHOQ PRDX1 MCB RSP04 SLC1A2 DGCR8 PRMT6 RHOA YOD1 PRKCA UBE2A ZFX PRKCI NCOAT NR3P LPIN1 UBE2B PRKCB LEFTY1 RECQL EYA1 BTG2 DMC1 GPAM CPLX2 EGLN3 HIATL1 NR3C1 SMUG1 NPAS3 TSC22D2 POU2F3 MAP3K1 PAFAH1B1 SCNN1G ERCC4 TEX261 SCO1 TXNIP GLRB GNAO1 SLC12A2 H2-M3 OLR1 CREB1 SMC6 SAMHD1 TRANK1 VSX1 LEP IFIT2 CUL4A CASP12 SLC18A2 IFNA12 PDC CRH JAK1 MAPK8IP3 SLC18A1 CUL4B SETD2
50896	resposta a estímulo	8,88E-12	257/1880 13.6%		RAB9B IL6ST SYNJ1 TNFSF15 LPAR3 RHOQ FGF13 ITSN1 RGL1 EDNRB NISCH B230120H23RIK RHOA PIK3CA RALA RHOQ RAPGEF4 CALCRL RAB6A AGAP1 FGF1 ERRF1 FR52 ARL5B MAP2K6 RHOH PRKCA RAP2B IKBKAP RAP2A CCDC88A ROCK1 BRAF PIK3C2B SYNJ2BP GEM SOCS5 STK4 GRM1 TANK ARHGAP31 RND1 DOK3 RASGRF2 GRM8 GRM7 CAR8 RAB5A PDGFRB ARL8B NKIRAS1 IRAK1BP1 ARL4A RAB3C PTPLAD1 CDC42SE1 IRAK4 RAB43 MAP3K1 RB1CC1 RHOBTB2 RAB11A BCL6 ADRA2B SCO1 FGD4 RAB8A MAP2K3 FZD2 NPR3 RCAN3 RAB7L1 GSG2 RALGDS RAB33B RASL11B RPS6KA5 ICK PRLR RAB1 RAB22A ARF4 IKBKG YWHAQ JAK1 MAPK8IP3 RAP1B RAB38 IKBKB
35556	transdução de sinal intracelular	4,16E-11	89/1880 4.7%		ASPN CYTIP FGF9 IL6ST GRIK2 HMGCR BTRC PREX2 TNFSF15 PRRX1 LPAR3 ITSN1 PTEN PRDX1 RGL1 CTNNB1 TBC1D15 SERPINE2 TIAM2 RHOA RAPGEF4 AGAP1 RAMP1 ERRF1 FR52 MAP2K6 PRKCA ARHGEF4 MAGI1 SOCS2 BRAF ARHGEF17 PDE4D UBE2I GRM1 PRKCB ACVR2A RASGRF2 EREG NCOA3 NPTN AKAP6 ADAM17 TBC1D8B KALRN FGFR2 FGFR1 ONECUT2 CDC42SE1 ASAP1 D630037F22RIK NR3C1 AKAP11 PEX5L PHIP RGMA VRK3 MAP3K1 FASL PAFAH1B1 BCL6 ADRA2B RASA3 IQSEC3 TRAM1 IQSEC1 FGD4 APC SCO1 TBC1D10B MAP2K3 IGF1 FRZB RALGDS LEP NOTCH1 AIDA SLC7A2 IKBKG LRP6 TMOD2 MAPK8IP3 WIF1 TNK1 RGS9 GHSR IKBKB ARAP2 KLF4 PDCD7 DUSP6
35466	regulação de via de sinalização	9,77E-10	91/1880 4.8%		HLF CDC14B BTRC ZMAT3 DICER1 SNCA RHOQ FOXO4 LATS1 PRDX1 CTNNB1 PGR SLC1A2 5730403B10RIK DGCR8 MYOCD ATG5 CYP7A1 PRMT6 TRP63 RHOA NSMCE2 PRKACA ERRF1 FANCC PRKCA POLK UBE2A RBBP5 DTL GEN1 USP1 PRKCI LIG3 GTF2H3 NCOAT7 LIG4 LPIN1 UBE2B GTF2H2 GTF2H1 DCLRE1C RECQL EYA1 BTG2 CX3CR1 SMARCA5 DMC1 GPAM SERP1 FGFR2 TFAP4 PTPLAD1 NR3C1 RRM2B OBFC2A TTCS CCNG1 SMUG1 IRAK4 PHIP TRP53BP1 SORBS1 MDC1 MAP3K1 RB1CC1 ADRA2A RAD51L3 POLQ ASF1A ERCC4 FGD4 SELP SLC8A1 SHPRH PTPN2 AXL SMC6 TRANK1 BRCA1 ATM ATP7A IFIT2 CDKN1A CUL4A CASP12 BNC1 MAPK8IP3 RAD54B CUL4B GHSR CHAF1A VLDLR
51716	resposta celular a estímulo	1,12E-09	93/1880 4.9%		CYTIP FGF9 GRIK2 HMGCR BTRC PREX2 TNFSF15 LPAR3 ITSN1 PTEN PRDX1 RGL1 CTNNB1 TBC1D15 SERPINE2 TIAM2 RHOA RAPGEF4 AGAP1 ERRF1 FR52 MAP2K6 PRKCA ARHGEF4 MAGI1 BRAF SOCS2 ADAMT520 ARHGEF17 PDE4D UBE2I SOCS5 GRM1 PRKCB RASGRF2 EREG AKAP6 TBC1D8B KALRN FGFR2 MYO5A FGFR1 CDC42SE1 ASAP1 D630037F22RIK AKAP11 PEX5L VRK3 MAP3K1 PAFAH1B1 BCL6 ADRA2B RASA3 IQSEC3 IQSEC1 FGD4 SCO1 APC TBC1D10B MAP2K3 IGF1 RGS17 RALGDS LEP PPP1R2 AIDA SLC7A2 IKBKG MAPK8IP3 TNK1 RGS9 IKBKB ARAP2 KLF4 PDCD7 DUSP6
23051	regulação do processo de sinalização	2,81E-09	76/1880 4.0%		

33554	resposta celular a estresse	2,40E-08	64/1880	3.4%	HLF CDC14B ZMAT3 SNCA FOXO4 PRDX1 5730403B10RIK ATG5 PRMT6 RHOA TRP63 NSMCE2 ERRF1 FANCC POLK RBBP5 UBE2A GEN1 DTL USP1 LIG3 GTF2H3 NCOA7 LIG4 UBE2B GTF2H2 GTF2H1 DCLRE1C RECQL EYA1 BTG2 SMARCA5 DMC1 SERP1 PTPLAD1 RRM2B OBFC2A CCNG1 TTC5 SMUG1 IRAK4 TRP53BP1 MDC1 MAP3K1 RB1CC1 RAD51L3 POLQ ERCC4 ASF1A FGD4 SHPRH AXL SMC6 TRANK1 BRCA1 ATM ATP7A CDKN1A CUL4A CASP12 MAPK8IP3 RAD54B CUL4B CHAF1A
6950	resposta a estresse	8,69E-08	135/1880	7.1%	JUB PTGS2 GRIK2 PTGS1 SNCA FOXO4 BDNF 5730403B10RIK ATG5 INSIG2 SERPINE2 SERPINE1 ATF6B TRP63 SPON2 POLK LNP DTL USP1 COLEC10 LIG3 LIG4 MECOM CLEC4N DCLRE1C THBD MTF1 F3 SMARCA5 ABAT SRXN1 HMGB1 DERL2 IFIH1 CYSLTR1 PTPLAD1 RRM2B OBFC2A CCNG1 TTC5 GCLM MANF IRAK4 TRP53BP1 IL17A ITGB6 ADRA2A NKX2-1 RAD51L3 POLQ ASF1A DNAJA2 FGD4 SHPRH MAP2K3 GABRA5 TRPC7 BRCA1 ATM ATP7A CDKN1A UCP3 SLC7A2 CIRBP RAD54B HDAC9 CHAF1A CACNA1A HLF CDC14B TOLLIP ZMAT3 ACOT2 PRDX1 MBP EDNRB SLC1A2 IL1RAP PRMT6 RHOA NSMCE2 YOD1 ERRF1 FANCC PRKCA UBE2A RBBP5 GEN1 GTF2H3 NCOA7 NLRP3 UBE2B GTF2H2 GTF2H1 RECQL EYA1 BTG2 IL20RB GRM7 IL12B DMC1 GPAM CLN8 SERP1 EGLN3 SMUG1 TSC22D2 MDC1 POU2F3 MAP3K1 RB1CC1 TRP53INP1 SCNN1G CLEC2H ERCC4 TXNIP POLR3G SELP POLR3F SLC8A1 SLC12A2 H2-M3 OLR1 ATRN AXL SMC6 SAMHD1 TRANK1 CUL4A CASP12 IFNA12 CRH MAPK8IP3 CUL4B VLDLR
23052	sinalização	3,56E-07	331/1880	17.6%	RP1 NPCD SYT4 IL6ST SNCA LPAR4 LPAR3 RORR PRKG1 ITSN1 CTNNB1 NOV PGR BDNF PPP1R1C B230120H23RIK PIK3CA RAPGEF4 MAP2K6 PITX2 IKBKAP MAGI2 ROCK1 BRAF ADAMTS20 SYNJ2BP GEM TANK CTNNA2 PLAUR FAM123B RND1 CAMK4 PGR15L F3 CX3CR1 PDGFRA CAMK1 PDGFRB ABAT ARL8B UNC13B ADAMTS5 IRAK1BP1 GNAI3 CNIH RHPN2 PTPLAD1 CACNB2 VIT ARFGEF2 SPNB2 NKX2-1 FGL2 TRAM1 KLF6 TCF7 MAOA MAP2K3 TGFBR2 ESRRG SMAD2 HOMER1 RAB7L1 AFG3L2 HOMER2 EPHA2 ATM EPHA5 NOTCH1 BCL2A1D DCP1A RAB1 NTRK2 ARF4 TMOD2 OLFTR70 TNK1 RGS9 STXBP3A GHSR SCHIP1 GPR165 HLF GM98 FGF9 SYNJ1 GPR82 LAT51 GLI3 PTEN EDNRB NISCH IL1RAP GUCY1A3 RAB6A AGAP1 FGF1 ERRF1 ARL5B ARHGEF4 RAP2B RAP2A CMKLR1 PIK3C2B TLE4 MESDC2 GRM1 GPR98 GPR37L1 QK DACT1 DOK3 IL20RB EREG GRM8 XPR1 GRM7 RAB5A ADAM17 IL12B CLN8 CLOCK SERP1 SRGAP2 ARL4A MYO5A RAB3C OLFTR1443 FKBP1A NEO1 GNG12 PDAP1 PHIP RAB43 SORBS1 PDE1C SORBS2 DGKG RB1CC1 RAB11A FASL BCL6 HBP1 RASA3 CLEC2H SNAP25 HSD17B7 DLGAP1 DLGAP2 ATRN PDK4 NLGN1 AXL IGF1 FZD3 FZD2 NPR3 GRIA4 FZD4 FZD6 RP56KA5 CSNK1D CDON RASSF2 RAB22A BNC1 YWHAQ LRP6 LRP8 RAB38 NR5A2 LRP2 GFRA3 GNA14 MTS51 THRB RAB9B GABRB3 GABRB2 GRIK2 BTRC TNFSF15 ILDR2 FGF13 FOXO4 RGL1 PTGIR 5730403B10RIK ANK2 TIAM2 GPR45 MRGPRX2 OLFTR558 TRP63 NSG1 RALA UNC5D ELTD1 ROBO2 UNC5C OLIG2 MLL3 FRS2 ODZ2 SOCS2 PDE4D ARNTL SOCS5 STK4 ASB8 RASGRF2 CAR8 RNF138 STMN1 VAMP2 CPD AKAP2 KALRN FGFR2 ZFAND5 FGFR1 PLXNC1 CYSLTR1 CDC42SE1 CXXC4 DDCDC2A CCNG1 IRAK4 HOXA5 ITGB6 RHOBTB2 ADRA2A ANGPTL1 ADRA2B TRAF5 TRAF4 FGD4 TRAF3 RAB8A PTPN2 GABRA5 LIN7C BRCA1 RAB33B LIN7A ITGA9 LYVE1 GPR37 PDE7A GLS IKBKG WIF1 RAP1B ADAM22 CACNA1C IKBKB ABL1 ABL2 CACNA1A PREX2 PAX6 RHOQ ARHGAP15 MBP RSP04 ARHGAP6 RHOA RHOC CALCRL RAMP1 SHC4 RHOH PRKCA CDC88A UGT8A SLA2 PRKCI ARHGAP29 UBE2B PRKCB ACVR2A ARHGAP31 NPYX ARHGAP33 NCOA3 DEF8 NKIRAS1 IFT88 GPR12 CPLX2 NR3C1 GPRC5B RGM8 NPAS3 SYN1 MAP3K2 ZFP191 MAP3K1 PIKFYVE CYP26B1 GPR101 PAFAH1B1 POU3F2 SCO1 APC DTX4 TXNIP GLRB GNA01 OLR1 CEP192 CREB1 CBL RGS17 RCAN3 FRZB GSG2 RALGDS RASL11B LEP ICK PRLR CASP12 SLC18A2 GRLF1 JAK1 MAPK8IP3 SLC5A7 ARAP2 BMPR1A
7267	sinalização célula-célula	9,14E-07	53/1880	2.8%	SYT4 GABRB3 GRIK2 FGF9 SNCA SYNJ1 ILDR2 CTNNB1 BDNF TRP63 RAPGEF4 FGF1 FRS2 PRKCA CTNNA2 CAMK4 GRM8 ABAT VAMP2 UNC13B CLN8 MYO5A FGFR2 FGFR1 CPLX2 CACNB2 SYN1 HOXA5 NKX2-1 PAFAH1B1 SNAP25 DLGAP1 GLRB DLGAP2 MAOA GABRA5 NLGN1 LIN7C SMAD2 FZD2 GRIA4 LIN7A LEP GLS NTRK2 TMOD2 SLC18A2 STXBP3A SLC5A7 LRP2 GHSR CACNA1C CACNA1A
3001	geração de sinal na sinalização célula-célula	2,45E-06	23/1880	1.2%	MYO5A CPLX2 SYT4 SYNJ1 NLGN1 LIN7C ILDR2 SMAD2 LIN7A LEP BDNF SYN1 NTRK2 SLC18A2 RAPGEF4 STXBP3A VAMP2 CACNA1C GHSR LRP2 SNAP25 UNC13B CACNA1A
10627	regulação da cascata de quinase intracelular	1,77E-05	32/1880	1.7%	FGFR2 FGFR1 GRIK2 FGF9 BTRC CDC42SE1 LPAR3 AKAP11 ITSN1 PTEN PRDX1 CTNNB1 VRK3 MAP3K1 RHOA APC FGD4 MAGI1 BRAF SOCS2 IGF1 PDE4D GRM1 PRKCB LEP AIDA MAPK8IP3 AKAP6 IKBKB PDCD7 KLF4 DUSP6
2376	sistema imune	1,02E-03	72/1880	3.8%	BMI1 HLF TOLLIP ELF4 SNCA SUSD2 TNFSF15 SKAP2 CBFA2T3 PRDX1 CXCL12 MBP CTNNB1 IL1RAP SPON2 MLL1 MYST3 FANCC RHOH PRKCA SLA2 LIG4 NLRP3 MECOM BCL2L1 CLEC4N PRKCB DCLRE1C PGM3 IL20RB CD34 CX3CR1 PI4K2A ADAM17 IL12B GPAM HMGB1 CPLX2 IFIH1 AHCTF1 FKBP1A SFXN1 RAG2 VIT IL7R BCL11B PPP3CB FASL BCL6 TEX261 APC SCO1 POLR3G SELP POLR3F H2-M3 JARID2 IL7 TGFBR2 CTLA4 SAMHD1 ATM ATP7A TNFSF10 BCL2A1D HOXB7 SLC7A2 EPB4.2 IKBKG HEPH HDAC9 IKBKB

Figura 18: Rede integrativa contendo os miRNAs e os genes alvos filtrados. Ao todo são 6 miRNAs e 788 genes referentes aos 18 processos biológicos selecionados (Tabela 3).

A partir desta rede contendo somente os genes relevantes, foi realizada a separação dos miRNAs e genes em dois grupos: o primeiro contendo os genes preditos e os miRNAs expressos no grupo experimental Alta Dose (miR-21-3p, miR-1894-3p, miR-1897-5p, miR-294-3p e miR-483-5p) e a segunda contendo os genes preditos e os miRNAs expressos no grupo experimental Baixa Dose (miR-494-3p e miR-21-3p), referentes ao Experimento 1 (Figura 19).

Figura 19: Rede integrativa dos miRNAs e os genes preditos filtrados em cada grupo experimental. A rede superior é referente ao grupo Alta Dose, e a rede inferior, referente ao grupo Baixa Dose.

Com o objetivo de identificar qual a diferença na modulação da resposta desencadeada pelo DNA plasmideal no tratamento com baixa dose, estes dois grupos de genes foram cruzados (Figura 20) em um diagrama e somente os genes exclusivos ao grupo experimental Baixa Dose (145 ao todo) foram utilizados nas análises posteriores.

Figura 20: Diagrama do número de genes entre os dois grupos experimentais. Estes números representam os 788 genes envolvidos com as categorias de GO selecionadas, sendo 340 genes alvos para os miRNAs expressos no grupo experimental Alta Dose, 145 genes alvos para os miRNAs expressos no grupo experimental Baixa Dose e 303 genes alvos compartilhados por dois ou mais miRNAs (Tabela 3).

Para este grupo de 145 genes exclusivos ao grupo experimental Baixa Dose, foi feita uma rede integrativa entre os genes alvos e o miRNA correspondente (Figura 21), e a partir desta rede foi realizada a análise pelo *plugin* ClueGO (Bindea, Mlecnik *et al.* 2009), por meio do programa *Cytoscape*. Esta ferramenta retorna um mapa e uma lista das vias celulares mais enriquecidas que contém os genes citados, sendo definido que um mínimo de dois genes alvos foi necessário para a via celular ser citada pelo programa.

Figura 21: Rede integrativa dos 145 genes alvos candidatos à modulação exclusivos ao grupo experimental Baixa Dose, e relacionado com os processos biológicos de interesse.

Como resultado desta análise, foi gerada uma rede das principais vias celulares, formadas de acordo com a ocorrência de dois ou mais genes alvos em cada, que foram separadas em *clusters* em diferentes cores para as vias relacionadas entre si e com genes compartilhados. Como se pode observar na figura 22, houve uma predominância de vias relacionadas a câncer, doenças autoimunes e infecções, vias relacionadas a metabolismo de macromoléculas, além de processos ligados à sinapse e vias relacionadas. Entretanto, houve uma grande quantidade de genes alvos presentes em vias de sinalização e resposta celular que vão desde apoptose, interação de receptores de citocinas a vias de detecção de PAMPs, como a do TLR, RIG-I, sensores de DNA citosólico e cascatas de sinalização como as da TGF- β , Jak-STAT e quimiocinas.

Esta rede de vias foi posteriormente filtrada e mantida somente os processos relacionados a sinalização e resposta celular, as quais foram adicionados os genes alvos participantes (Figura 23).

Figura 22: Rede de vias celulares que contém os genes selecionados. O mapa foi gerado pelo *plugin* ClueGO, no programa *Cytoscape*, onde a lista de genes, provenientes da Figura 21, foi usada como dados para a geração desta rede. As vias foram formadas de acordo com a ocorrência de dois ou mais genes, e vias relacionadas com genes compartilhados foram agrupadas em *clusters* separadas por cores.

Figura 23: Rede das vias celulares e os respectivos genes alvos. Após a predição da rede na Figura 22, a mesma foi filtrada para retirada de vias relacionadas a câncer e outras doenças, permanecendo as vias de interesse. Por meio do *plugin* ClueGO, foi feita a adição dos genes alvos para cada “nó” presente no mapa.

4.6. Evidência *in silico* do sítio de interação miRNA:mRNA (genes alvos)

Dentre os genes alvos incluídos nestas principais vias celulares (Figura 23) foram escolhidos aqueles mais importantes, ou seja, compartilhados em várias vias ou com funções relevantes como, fatores de transcrição, citocinas ou proteínas essenciais na transdução de sinais. A partir deste critério, dos 37 genes incluídos na

rede acima (Figura 23) foram escolhidos os genes I κ B κ β , Traf3, Jund, I κ N α 12 e Tank para a confirmação *in silico* da existência de sítios de ação do miRNA e validação da interação miRNA:mRNA.

Esta análise foi realizada usando o programa de bioinformática *RNAhybrid* v.2.2 o qual é capaz de calcular a energia livre de hibridização mais favorável para a ligação entre as moléculas de RNA, por meio da análise da sequência e da estrutura secundária dos mesmos. Abaixo estão discriminadas as interações entre o miRNA miR-494-3p e os genes alvos escolhidos (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado da evidência *in silico* do sítio de interação miRNA:mRNA. Para cada par de interações, está especificado o sítio de ligação no gene e a energia livre mínima (*mfe*). A análise foi feita usando o programa *RNAhybrid* v2.2.

Interação miRNA:mRNA					Sítio	<i>mfe</i> * (kcal/mol)
IκB$\kappa$$\beta$ - Inibidor da kappaB quinase beta (4540 nt)						
mRNA	5'	C	C	GUAA	A	3'
		UCCC	UG	AUGUUUCA		
		AGGG	AC	UACAAAGU	3751	-21,1
miRNA	3'	CUCCAA	C	A		5'
mRNA	5'	U	C	C	U	3'
		GU	UCCUG	GUG	UGUUUC	
		CA	AGGGC	CAU	ACAAAG	2897
miRNA	3'	CUC	A	A	U	5'
Traf3 - Receptor de TNF associado a fator 3 (6906 nt)						
mRNA	5'	A	AUUUGGUAUUUAU	UUUGAGGUCUUGCG	U	3'
		AGGUUUC		UUGUGU	AUGUUUC	
		UCCAAAG		GGCACA	UACAAAG	6758
miRNA	3'	C			U	5'
Jund - Fator de transcrição Jun D (2878 nt)						
mRNA	5'	U	GCGUG	GA	C	3'
		GGUU	UU	GUGUGUGUUUC		
		CCAA	AG	CACAUACAAAG	2661	-23,6
miRNA	3'	CU	GG		U	5'

mRNA	5'	G	CA	G G	CAGAGUGAGAUUC	A	3'		
		GAGGU	UUCU	G GUA		UGUUUCA		61	-22,9
		CUCCA	AAGG	C CAU		ACAAAGU			
miRNA	3'			G A			5'		
Ifn α 12 - Interferon alfa 12 (797 nt)									
mRNA	5'	A	A	G			A	3'	
		GA	GUU	CCU	UG	AUGUUUCA		742	-18,9
		CU	CAA	GGG	AC	UACAAAGU			
miRNA	3'		C	A	C	A		5'	
TANK - Ativador de Nf-kappaB associado a membro da família TRAF (2018 nt)									
mRNA	5'		G	U	GUG	G	3'		
			UUC	CUGUG		GUUUU		1429	-18,0
			AAG	GGCAC		CAAAG			
miRNA	3'	CUCCA			AUA		U	5'	

**mfe = minimum free energy*

4.7. Dosagem dos genes por RT-qPCR

Após as análises computacionais, o gene candidato à regulação pelo miR-494-3p escolhido foi o I κ B κ , o qual foi dosado por RT-qPCR para comprovar que o gene estava sendo expresso nos grupos experimentais testados (Figura 24).

Figura 24: Dosagem do gene I κ B κ por RT-qPCR para confirmação da expressão. *ANOVA (p < 0,05).

Também foram dosadas, pela RT-qPCR, as citocinas Interferon do tipo I (IFN- α e β) para verificar o efeito da baixa dose plasmideal na diminuição da produção de citocinas inflamatórias (Figura 25).

Figura 25: Dosagem dos interferons do tipo 1 por RT-qPCR. *ANOVA ($p < 0,05$).

4.8. Detecção da proteína *phospho-IkB* por *western blot*

A proteína *IkB* é regulada diretamente pela *IkB κ* . Para a quantificação da proteína *phospho-IkB* foi realizado o ensaio de *western blot*. O extrato proteico total foi separado (Figura 26), transferido para membrana de nitrocelulose (Figura 27) e as bandas detectadas foram quantificadas por densitometria (Figura 28).

Figura 26: SDS-PAGE do extrato proteico total das amostras estimuladas com LPS e pcDNA3, conforme experimento 2. Visualização por meio da coloração com *Coomassie Blue*.

Figura 27: *Western blot* para a proteína *phospho-IkB*. A transferência foi feita para membrana de nitrocelulose e a detecção feita pelo método da reação da peroxidase (DAB).

Figura 28: Representação gráfica da densitometria das bandas detectadas pelo *western blot*. **ANOVA ($p < 0,05$).

5. Discussão

Dentre as várias propriedades da molécula de DNA, a sua conformação tridimensional e o seu conjunto de características estruturais fazem desta molécula uma importante ferramenta no estudo dos receptores celulares envolvidos na captação da mesma. Além disso, o perfil da resposta celular frente a este estímulo está intimamente relacionado a processos de defesa contra invasão de patógenos, sendo eles vírus ou bactérias ou ativação de vias celulares relacionadas a dano celular (Barbalat, Ewald *et al.* 2011). Para complementar, uma grande quantidade de estudos tem sido desenvolvida com o objetivo de caracterizar a aplicação do DNA na terapia vacinal (Ulmer, Wahren *et al.* 2006; Rice, Ottensmeier *et al.* 2008; Almeida, Trombone *et al.* 2011).

A presente dissertação de mestrado faz parte da linha de pesquisa sobre terapia gênica do grupo coordenado pela Prof^a Dr^a Arlete A. M. Coelho-Castelo do Laboratório de Imunoterapia Gênica. Recentemente, trabalhos relacionados à caracterização das vacinas de DNA têm sido desenvolvidos no sentido de aperfeiçoar a dose do plasmídeo, sua biodistribuição, esclarecer o tráfego intracelular desde a sua captura até a realização da sua função e esclarecer o mecanismo de modulação desta resposta (Coelho-Castelo, Trombone *et al.* 2006; Trombone, Silva *et al.* 2007; Malardo 2009; Almeida, Trombone *et al.* 2011). Nosso grupo mostrou também, pela primeira vez, que a vacinação com mRNA_{hsp65} é eficaz no controle da tuberculose e que o gene inserido no plasmídeo era transcrito diretamente no citoplasma e não no núcleo (Lorenzi, Trombone *et al.* 2010). Atualmente utilizamos uma nova abordagem de terapia gênica, utilizando a baixa dose de DNA plasmideal (preconizado para 10 µg/mL) como indutora de um perfil anti-inflamatório nas células. Os resultados obtidos em modelos *in vivo* indicam que a baixa dose de DNA plasmideal administrada em camundongos, que foram induzidos a choque endotoxêmico por LPS, é capaz de amenizar o quadro inflamatório, como na diminuição da pressão arterial, frequência cardíaca, temperatura corpórea e da produção de citocinas inflamatórias (Malardo 2009). Também foi caracterizada a propriedade das baixas doses de DNA na inibição da apresentação de antígenos pelas APC's, que ao ser fagocitada por estas células, impedia a acidificação das vesículas endossomais inibindo o processamento e

apresentação do antígeno a linfócitos T CD4+, diminuindo a proliferação celular em resposta a este antígeno (Trombone, Silva *et al.* 2007).

Este fenômeno, exclusivamente caracterizado pelo grupo, leva à utilização desta nova abordagem na aplicação do controle de vários aspectos da resposta imunológica, bem como na modulação da terapia gênica. Deste modo, esta propriedade anti-inflamatória do DNA em baixas concentrações pode possibilitar o controle das respostas celulares exageradas, inflamações e doenças autoimunes.

Recentemente, foi iniciada uma nova linha de estudo envolvendo a caracterização da resposta imunológica frente o estímulo de dsDNA, com o objetivo de esclarecer, baseando-se na cascata de sinalização celular disparada por esta molécula, quais as possíveis modificações estariam ocorrendo no direcionamento da resposta que levariam às manifestações observadas pelo nosso grupo. Visto isso e a grande importância que a nova camada de regulação da expressão gênica, direcionada pelos miRNAs, tem demonstrado, tornou-se evidente que estas moléculas poderiam participar do controle dos mais variados processos celulares, incluindo a resposta celular à baixa dose de DNA plasmideal.

A descoberta dos miRNAs como importantes reguladores da expressão gênica, abriu as portas para a caracterização destas moléculas nos mais diversos processos fisiológicos, passando por, desde a formação de órgãos e tecidos, à participação em processos-chave no desenvolvimento de doenças. Em relação ao sistema imunológico, todos os processos celulares básicos relacionados a este sistema, como maturação, proliferação, diferenciação e ativação celular tem sido bastante estudados tornando clara e cada vez mais significativa a participação dos miRNAs na regulação dos mesmos. Baseando-se na crescente importância destas moléculas, focamos nosso trabalho na identificação e caracterização de miRNAs que poderiam estar relacionados a estes processos.

Considerando as observações feitas acima, e para analisarmos a influência da baixa dose de DNA plasmideal aliada ao papel dos miRNAs na resposta celular foi necessário verificar se somente o estímulo com dsDNA, no caso o vetor plasmideal pcDNA3 (Figura 3), em diferentes concentrações, seria suficiente para modular diferencialmente a expressão dos miRNAs em macrófagos. Por serem células apresentadoras de antígenos, os macrófagos são elementos cruciais da resposta imunológica inata bem como da resposta imunológica adquirida, e por

participarem efetivamente na captura de antígenos e ativação das células de defesa, este tipo celular foi escolhido como modelo de estudo visto a sua importância no contexto imunológico (Iwasaki e Medzhitov 2010).

Para isto, foi realizado o experimento 1 (Figura 4), no qual utilizamos a tecnologia de *microarray* para caracterizar o perfil de miRNAs expressos em macrófagos ativados com DNA plasmideal. Ao comparar-se os resultados obtidos para os três grupos experimentais Controle, Baixa Dose e Alta Dose, foram definidos como diferencialmente expressos os microRNAs miR-494-3p (mais expresso no grupo Baixa Dose em relação aos grupos Controle e Alta Dose), o miR-21-3p (mais expressos nos dois tratamentos em relação ao controle, porém em maior quantidade no grupo Alta Dose) e os miRNAs miR-1897-5p, miR-1894-3p, miR-483-5p e miR-294-3p (mais expressos no grupo Alta Dose) (Figura 10 e 11). Visto isso, os resultados sugerem que a molécula de pcDNA3, por si só, em diferentes concentrações, foi capaz de induzir a expressão diferencial de três miRNAs nestas células.

Dos 6 miRNAs identificados, pouco se tem descrito na literatura, a não ser sobre câncer e outras patologias em seus mais diversos tipos (Ohdaira, Sekiguchi *et al.* 2012), levando-se em consideração que esta é a área mais estudada em relação a estas moléculas.

A respeito do miR-494, ele foi descrito como induzido em baço de camundongo estimulado intraperitonealmente com LPS, aumentando sua expressão em cerca de 5 vezes (Niu, Mo *et al.* 2011). Também foi detectado como induzido em células epiteliais de camundongo e humano em resposta a poluentes ambientais (Sonkoly e Pivarcsi 2011) além de regular negativamente a fosfatase PTEN, envolvida no crescimento celular, apoptose e diferenciação, em resposta a substância carcinogênica (Liu, Jiang *et al.* 2010). Por sua vez, o miR-21-3p quase não apresenta descrição na literatura, ao contrário do seu miRNA complementar, o miR-21 (ou miR-21-5p) que está envolvido na regulação de vários processos inflamatórios, inclusive na via de sinalização por TLR (Quinn e O'Neill 2011).

Já o miR-294, está altamente relacionado ao desenvolvimento de células tronco embrionárias, regulando principalmente a proliferação e o ciclo celular (Lichner, Pall *et al.* 2011; Heinrich e Dimmeler 2012). Entretanto, para os outros miRNAs, miR-483, miR-1894-3p e miR-1897-5p, não foi achado qualquer estudo

descrito em relação a ativação de macrófagos e cascata de sinalização, e isto, somado às suas não detecções pela RT-qPCR, além do baixo número de genes alvos preditos para estes miRNAs (Figura 16), sugerem uma menor relevância destes na regulação do processo em estudo.

Baseado nos resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, nos quais foi estudado o papel das baixas doses de dsDNA em modelos que envolviam um contexto de resposta imunológica de células ativadas e de perfil inflamatório foi necessário verificar se o pcDNA3 em baixa concentração, poderia induzir o mesmo microRNA (miR-494-3p) que foi identificado neste trabalho. Para isso, realizamos o Experimento 2 (Figura 5) no qual foi padronizado um modelo em que estas células ou foram estimuladas com LPS (500 ng/mL) por 2 horas antes dos tratamentos com o plasmídeo pcDNA3 ou receberam o primeiro estímulo ao mesmo tempo em que foram tratadas com o DNA plasmideal.

O macrófago é um dos principais tipos celulares do sistema imunológico, participando ativamente na destruição de patógenos como na ativação de células especializadas, sendo considerado o principal sensor de perigo do organismo. É por meio dos receptores citosólicos e de membrana que esta célula exerce seu papel. Este conjunto de receptores (PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões) detecta uma grande variedade de classe de moléculas tanto próprias como não próprias ao hospedeiro, que são chamados de PAMPs (padrão molecular associado a patógeno). Dependendo de cada PAMP e cada receptor, a cascata de sinalização mais apropriada é disparada para se obter a resposta mais efetiva contra determinado patógeno. Em nosso modelo de ativação, usamos o LPS, uma das mais bem estudadas moléculas imunoestimulatórias, como por exemplo em modelos de inflamação sistêmica e sepse (Beutler e Rietschel 2003). Esta molécula é detectada pelos macrófagos exclusivamente pelo receptor do tipo Toll 4 (TLR4) auxiliado por outras proteínas (Miyake 2007), por meio do qual é desencadeada uma resposta a este estímulo. A partir disso, duas cascatas de sinalização são iniciadas, uma dependente da molécula adaptadora MyD88 e a outra de TRIF, que por meio de segundos mensageiros ativam vários fatores transcricionais como $\text{Nf-}\kappa\text{B}$, AP-1 e os IRF's levando à produção de proteínas e citocinas específicas do perfil inflamatório adequadas ao tipo de resposta, dentre as quais podemos citar IL-6, IL-12, $\text{TNF-}\alpha$ e *interferons* do tipo I (Lu, Yeh *et al.* 2008).

Como observado em nossos resultados (Figura 14), em macrófagos estimulados com LPS, o tratamento foi capaz de induzir a produção do mesmo miRNA (miR-494-3p) que foi detectado no Experimento 1, reforçando o resultado de que este miRNA é principalmente expresso em resposta ao estímulo com pcDNA3 em baixa dose e sugerindo que o mesmo poderia modular negativamente a resposta celular ao LPS, visto que a ativação por este PAMP, levando a um contexto inflamatório, inibia a produção deste miRNA (Figura 14). Além disso, foi sugerido que o miR-494-3p exerceria o papel de amenizar o quadro inflamatório como observado em resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo.

Somados, estes resultados indicam que o macrófago ativado, quando tratado com baixas doses de DNA plasmideal, passa a expressar o miR-494-3p e que há uma amenização do quadro inflamatório, como detectado para a produção de citocinas. A partir disso foi necessário verificar a influência que este miRNA exerce na regulação da expressão gênica no contexto das vias e cascatas de sinalização em resposta ao LPS e DNA plasmideal.

Para isso, foi realizada a predição computacional de genes alvos para estes miRNAs usando o banco de dados *online* miRDB. Os parâmetros deste programa são baseados nas várias características primordiais da predição miRNA:mRNA como a localização do sítio de pareamento, a acessibilidade do sítio de pareamento favorecendo a menor energia de ligação, além do pareamento rigoroso das regiões *seed*; a principal característica para uma predição, visto que o grau de pareamento respeitando Watson-Crick aumenta a eficácia do reconhecimento do microRNA pelo mRNA alvo (Kuhn, Martin *et al.* 2008; Saito e Saetrom 2010). Juntos, estes requisitos ajudam a fornecer uma lista de dados mais confiáveis, apesar de restritos.

Como observado, os três miRNAs com maior número de alvos foram os detectados no ensaio de *microarray* e confirmados pela RT-qPCR, sendo eles o miR-494-3p com 506 alvos, o miR-21-3p com 709 alvos e o miR-294-3 com 441 alvos (Figura 16); o que em parte pode ser explicado pela maior participação destes miRNAs no contexto celular, visto que estes três estão mais descritos na literatura do que os outros.

Para identificar potenciais genes alvos participantes dos processos celulares e vias de sinalização relacionados ao foco do trabalho, a lista de genes foi filtrada para se obter somente aqueles genes de interesse, como regulação da expressão

gênica, resposta celular a estímulo, transdução de sinal intracelular, resposta a estresse, sistema imune, entre outros (Tabela 3). Dentro desta lista específica de genes, apenas aqueles exclusivos ao tratamento com baixa dose de DNA, que no caso foram preditos como alvos somente do miR-494-3p, foram separados para posteriores análises, totalizando 145 genes alvos (Figura 20 e 21).

A partir disto, realizamos uma análise destes genes na qual foi possível obter uma rede de todas as vias celulares que apresentavam estes como elementos (Figura 22), e como parâmetro do programa, as vias com pelo menos dois genes inclusos foram obtidas como resultado. Deste resultado, foram separadas as vias de interesse com os genes relacionados à modulação da resposta imunológica (Figura 23), dentre as quais podemos citar: sinalização via receptores Toll (Tank, Traf3, Ifn α 12, I κ B κ β e Map2k6), via de sensores de DNA citosólico (Ifn α 12 e I κ B κ β), cascata de MAPK (JunD, Rasgrf2, Map2k6, Cacna1c, Gng12, Ifn α 12 e I κ B κ β), via de detecção RIG-I (Tank, Traf3, Ifn α 12 e I κ B κ β) e via de apoptose (Casp12 e Ifn α 12), além da via de sinalização do TGF- β (Pitx2 e Bmpr1a), via de sinalização Jak-STAT (Socs5, IL-7 e Ifn α 12) e via de sinalização de quimiocinas (Cxcl12, Gng12 e I κ B κ β).

Para estudar o modelo específico do nosso trabalho, em que o macrófago é estimulado com LPS, desencadeando cascatas de sinalização específicas e que o tratamento com DNA plasmideal em baixa concentração, quando detectado pela célula, é capaz de modular esta resposta, selecionamos 5 genes que em nossos critérios estariam mais relacionados aos processos citados (I κ B κ β , Ifn α 12, Traf3, Tank e JunD).

O gene I κ B κ β (I kappa B quinase β), também conhecido como IKK- β ou IKK2, codifica uma proteína do complexo IKK, principal responsável pela inibição da I κ B α , subunidade inibidora do fator de transcrição NF- κ B. Porém seu papel vai além do que apenas regular este fator de transcrição. A principal função desta subunidade é levar os estímulos proinflamatórios e sinais gerados pelos PAMPs à ativação de diferentes fatores transcripcionais, servindo como regulador da resposta imunológica (Karin 2005). A ativação desta proteína, IKK- β , está associado à estimulação de vias antiapoptóticas, proinflamatórias e proliferativas (Perkins 2007), semelhante ao observado em nossos resultados pela sua ocorrência em diversas vias de sinalização (em pelo menos 6) (Figura 23). Em relação à sua modulação por

miRNAs, já foi descrito que o gene da IKK- β é regulado pelo miR-199a em células ovarianas cancerosas em humanos (Chen, Alvero *et al.* 2008).

O gene *Ifn α 12* codifica a citocina IFN- α , que faz parte da família de *interferons* tipo I e consiste de vários subtipos em diferentes espécies. Somente em camundongos há pelo menos 14 tipos de IFN- α , relacionados a vários processos. O *Ifn α 12* possui propriedades antivirais e antiproliferativas (van Pesch, Lanaya *et al.* 2004), e já foram caracterizadas suas funções em processos de crescimento celular e apoptose além de classificada como indutora da expressão de MHC-I (Tsang, Leung *et al.* 2007). Estas observações são congruentes com os nossos resultados (Figura 23) da grande participação deste gene nas vias de sinalização (pelo menos em 7 vias) relacionadas às descritas na literatura.

O gene *Traf3* (fator associado a receptor de TNF) por sua vez, codifica uma proteína intracelular que tem como função principal a transdução de sinais das cascatas iniciadas por receptores da família do TNF (TNFR), dos receptores do tipo Toll (TLR), dos receptores da família da interleucina-1 (IL-1R) e receptores RIG-I (RLR). Esta molécula apresenta funções tanto como regulador negativo quanto positivo, dependendo da via celular que participa e do sinal recebido, e está envolvida na produção de citocinas como *interferons* tipo I e na sobrevivência celular (Oganesyan, Saha *et al.* 2006; Hacker, Tseng *et al.* 2011). A descrição deste gene na sinalização das vias MAPK e ativação da NF- κ B, faz deste gene um importante candidato da regulação pelo miR-494-3p.

O gene *Tank* (quinase associada à Traf), codifica uma proteína que faz parte do complexo TBK1 (Tank-binding kinase 1), que também participante das vias de sinalização por receptores do tipo Toll (TRL) e RIG-I (RLR), está relacionada à transdução de sinais em resposta à detecção de moléculas de DNA (Ishii, Kawagoe *et al.* 2008). Sua participação nestes processos de sinalização e interação com os genes anteriormente citados (Clark, Takeuchi *et al.* 2011) despertou nosso interesse em relação a este gene ser alvo do miR-494-3p e esta presente nos nossos resultados.

Por último, escolhemos também o gene *JunD*, que codifica a proteína Jun D, relacionado principalmente na transdução de sinais da via MAPK. Essa subunidade faz parte do fator transcricional AP-1 que tem como papel estimular a expressão de citocinas inflamatórias. O gene *jun D* também foi descrito por possuir efeito regulador

negativo e positivo no crescimento celular e estar envolvido na sinalização de linfócitos T (Ruppert, Chehtane *et al.* 2012).

Posteriormente, evidenciamos *in silico* os sítios de interação entre o miR-494-3p e os 5 genes alvos escolhidos. Esta evidência torna-se essencial para indicar se a interação entre as moléculas é favorável respeitando as características estruturais e a energia envolvida no processo. Como observado, todos os genes apresentaram sítios de ligação para o miR-494-3p, sendo que a energia mínima livre satisfatória deve ser igual ou menor do que -20 (quanto mais negativo melhor), porém somente os genes JunD e IκBκβ, apresentaram mais do que um sítio de ligação, melhor energia de ligação e um pareamento das regiões *seed* mais perfeito (Tabela 4). Como o IκBκβ apresentou as melhores características de pareamento e por este gene fazer parte do final da cascata de sinalização disparada pelos receptores celulares, tanto para LPS como para dsDNA, e por regular um dos fatores de transcrição mais essenciais da modulação da ativação celular e resposta imunológica (NF-κB), ele foi escolhido para posteriores análises. Complementar a este resultado, foi avaliada a co-expressão do miR-494-3p e do gene IκBκβ por RT-qPCR, e como observado (Figura 24) este gene estava sendo transcrito possibilitando a interação entre o miRNA que também estava sendo expresso (Figura 14), após o estímulo com LPS e o tratamento com pcDNA3.

A identificação e validação de genes alvos para miRNAs, é uma área crescente na biologia molecular e tem-se obtido resultados significativos envolvendo uma grande quantidade de modelos de estudo. Entretanto, as tecnologias usadas para grande escala de dados como *microarrays*, programas de predição, dentre outros, são responsáveis pela alta identificação de resultados falso-positivos. No estudo funcional dos miRNAs, além da quantificação da sua expressão, predição de genes alvos e análises computacionais, é de extrema importância a caracterização prática dos efeitos biológicos ocasionados por esta molécula, visto que se basear somente nas ferramentas computacionais não sugere-se um resultado 100% confiável (Didiano e Hobert 2006; Kuhn, Martin *et al.* 2008).

Para isso, realizamos o ensaio de *western blot* (Figura 27 e 28) pelo qual mostramos que a fosforilação do inibidor IκB, a qual é dependente da ação da IκBκβ, foi significativamente inibida quando as células estimuladas com LPS foram tratadas com DNA plasmideal em baixa concentração. Em células estimuladas com LPS, o

disparo das cascatas de TLR, para gerar a resposta e amplificação da mesma, leva à expressão do gene I κ B κ , subunidade responsável pela fosforilação do inibidor I κ B. Se este não é fosforilado, a transdução de sinal via Nf- κ B fica parcialmente comprometida, levando à não funcionalidade deste fator de transcrição comprometendo a resposta celular (Figura 29). Visto que o I κ B é exclusivamente fosforilado pelo complexo IKK, sugere-se que o miR-494-3p pode estar regulando pós-transcricionalmente a expressão do gene I κ B κ (ou IKK- β), levando em conta que o mRNA deste gene está sendo transcrito e provavelmente não está sendo traduzido por meio da ação do miRNA, já que sua função foi comprometida.

Figura 29: Esquema representativo da ação do complexo IKK (que contém o IKK- β) na regulação do fator transcrricional Nf- κ B.

A partir dos dados observados, os resultados sugerem que o miR-494-3p exerce uma regulação negativa do complexo IKK, responsável pela ativação do fator de transcrição Nf- κ B. Este fator transcrricional, quando inibido, é incapaz de transcrever genes em resposta a um estímulo inflamatório. Estes dados fornecem evidências de que o tratamento com baixas doses de DNA plasmideal (pcDNA3) poderia amenizar o processo celular de resposta inflamatória. Para verificarmos isto, dosamos por meio da RT-qPCR, a expressão de citocinas inflamatórias (no caso, interferon do tipo 1) para se obter evidências de que o tratamento com dsDNA pode diminuir o perfil inflamatório celular. Os resultados para IFN- α e IFN- β , apesar de não haver diferença estatística entre os tratamentos, indicam uma tendência na diminuição da produção destas citocinas nos tratamentos com baixa dose de pcDNA3 (Figura 25). Acreditamos que essa diferença possa aumentar com o maior tempo de tratamento, visto que nos experimentos *in vivo* e *in vitro* de outros

trabalhos do grupo, o tempo de tratamento com DNA plasmideal é maior do que 4 horas.

Para complementar o trabalho, verificamos o papel dos receptores TLR9 na detecção do DNA plasmideal. Como caracterizado em vários estudos em macrófagos, o estímulo com dsDNA exógeno pode ser detectado por vários tipos de receptores celulares, tanto citosólicos como de membrana. No que diz respeito ao DNA plasmideal, este pode ser detectado por receptores Toll por meio do reconhecimento de sequências CpGs não metiladas (Wagner 2004). Entretanto, os vetores plasmideais não possuem uma grande quantidade destas sequências, e visto que a maioria dos trabalhos usam sequências ODNs ou agonistas sintéticos, os esclarecimentos sobre o papel dos receptores TLR no reconhecimento do DNA exógeno não são conclusivos, sugerindo que estes receptores detectam qualquer tipo de dsDNA, entretanto, a ocorrência de certos motivos e características estruturais predominantes nos genomas de vírus e bactérias, além da localização do receptor nos compartimentos endossomais, favorece a ligação e o reconhecimento de DNA exógeno proveniente de patógenos e não do próprio organismo (Haas, Metzger *et al.* 2008; Barbalat, Ewald *et al.* 2011). Outros estudos indicam a participação efetiva de receptores alternativos relacionados à recepção e transdução do estímulo proveniente desta molécula, como os receptores ou sensores citosólicos. Há, atualmente, vários tipos de receptores intracelulares descritos, como o DAI (Takaoka, Wang *et al.* 2007), RNA poll III auxiliado pela STING (Ablasser, Bauernfeind *et al.* 2009; Chiu, Macmillan *et al.* 2009; Barber 2011), além de outros fatores identificados, como IFI16 ou p204 (camundongo) (Unterholzner, Keating *et al.* 2010), DHX9, DHX36, LRRFIP1 e Ku70 (Kim, Pazhoor *et al.* 2010; Yang, An *et al.* 2010; Zhang, Brann *et al.* 2011) e de um modo geral o reconhecimento do DNA citosólico parece ser sequência independente e não afetada pelo padrão de metilação, sugerindo então que as moléculas de DNA próprias e não próprias ao organismo devem iniciar uma resposta por essas vias (Theofilopoulos, Kono *et al.* 2011).

Os microRNAs são transcritos ao mesmo tempo que os genes estão sendo transcritos e expressos em resposta a um determinado estímulo. O papel principal destas moléculas é regular naturalmente, por meio de um *feedback* negativo, a expressão exacerbada de determinados genes, regulando e controlando a

homeostase celular. Nosso interesse, baseado na cascata de sinalização disparada pelo DNA plasmideal e no papel regulador dos miRNAs, foi esclarecer se a expressão do miR-494-3p, significativamente maior em nosso tratamento com baixa dose de DNA, era dependente ou não da sinalização pelos receptores Toll, mais especificamente, o TLR9.

Como descrito no Experimento 3 (Figura 6) e observado em nossos resultados (Figura 15), sugere-se que a expressão do miR-494-3p não só é independente deste receptor, como a presença do mesmo no grupo experimental Alta Dose, em camundongos WT, inibe a expressão deste microRNA em resposta ao estímulo com pcDNA3, visto que em células *knockout* para este receptor, o miRNA em questão foi consideravelmente induzido. Em macrófagos peritoneais WT, o estímulo com baixa dose de pcDNA3 foi suficiente para induzir a expressão do miR-494-3p, como já observado em macrófagos de cultura (Figura 13). Juntos, estes dados sugerem que uma cascata de sinalização por outro tipo de receptor que não o TLR9, é responsável pela indução deste miRNA quando em estímulo com baixa dose de DNA plasmideal, entretanto, a grande quantidade de estímulo plasmideal (Alta Dose), no desencadeamento da resposta via Toll, mascara o estímulo da baixa dose, por meio da indução de vias de sinalização inflamatórias, inibindo o microRNA de ser expresso.

6. Conclusão

O tratamento com baixa dose de DNA plasmideal em nosso modelo, é capaz de induzir a expressão do miR-494-3p. Este miRNA tem como gene alvo a proteína I κ B κ β , que participa ativamente da cascata de sinalização celular em resposta a estímulos, onde atua na fosforilação da subunidade I κ B α inibidora do fator de transcrição NF- κ B, importante elemento da resposta celular. O papel da I κ B κ β é consideravelmente diminuído visto que sua proteína alvo fosforilada (I κ B α -P) não está expressa em macrófagos estimulados com LPS e tratados com baixa dose de DNA plasmideal.

Além disso, a expressão do miR-494-3p, na baixa dose de dsDNA é independente da expressão do receptor TLR9 e no tratamento com alta dose de DNA, a presença deste receptor inibe a expressão do miRNA.

7. Referência

- Ablasser, A., F. Bauernfeind, *et al.* (2009). "RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate." Nat Immunol **10**(10): 1065-1072.
- Akira, S., S. Uematsu, *et al.* (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Almeida, L. P., A. P. Trombone, *et al.* (2011). "B cells Can Modulate the CD8 Memory T Cell after DNA Vaccination Against Experimental Tuberculosis." Genet Vaccines Ther **9**: 5.
- Androulidaki, A., D. Iliopoulos, *et al.* (2009). "The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs." Immunity **31**(2): 220-231.
- Ashburner, M., C. A. Ball, *et al.* (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." Nat Genet **25**(1): 25-29.
- Baltimore, D., M. P. Boldin, *et al.* (2008). "MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function." Nat Immunol **9**(8): 839-845.
- Barbalat, R., S. E. Ewald, *et al.* (2011). "Nucleic acid recognition by the innate immune system." Annu Rev Immunol **29**: 185-214.
- Barber, G. N. (2011). "Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIM2 and the regulation of interferon production and inflammatory responses." Curr Opin Immunol **23**(1): 10-20.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.
- Basso, K., P. Sumazin, *et al.* (2009). "Identification of the human mature B cell miRNome." Immunity **30**(5): 744-752.
- Bazzoni, F., M. Rossato, *et al.* (2009). "Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(13): 5282-5287.

- Beutler, B. and E. T. Rietschel (2003). "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin." Nat Rev Immunol **3**(2): 169-176.
- Bindea, G., B. Mlecnik, *et al.* (2009). "ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks." Bioinformatics **25**(8): 1091-1093.
- Borchert, G. M., W. Lanier, *et al.* (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1097-1101.
- Calin, G. A. and C. M. Croce (2006). "MicroRNA signatures in human cancers." Nat Rev Cancer **6**(11): 857-866.
- Campbell, K., H. Diao, *et al.* (2003). "DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of *Leishmania amazonensis* protects mice against cutaneous Leishmaniasis." Infect Immun **71**(11): 6270-6278.
- Carpenter, S. and L. A. O'Neill (2009). "Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins." Biochem J **422**(1): 1-10.
- Ceppi, M., P. M. Pereira, *et al.* (2009). "MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2735-2740.
- Chen, R., A. B. Alvero, *et al.* (2008). "Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells." Oncogene **27**(34): 4712-4723.
- Chen, Z., S. Kadowaki, *et al.* (2001). "Protection against influenza B virus infection by immunization with DNA vaccines." Vaccine **19**(11-12): 1446-1455.
- Chiu, Y. H., J. B. Macmillan, *et al.* (2009). "RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway." Cell **138**(3): 576-591.
- Clark, K., O. Takeuchi, *et al.* (2011). "The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the IkappaB kinase family during Toll-like receptor signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(41): 17093-17098.

- Coelho-Castelo, A. A., R. R. Santos Junior, *et al.* (2003). "B-lymphocytes in bone marrow or lymph nodes can take up plasmid DNA after intramuscular delivery." Hum Gene Ther **14**(13): 1279-1285.
- Coelho-Castelo, A. A., A. P. Trombone, *et al.* (2006). "Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery." Genet Vaccines Ther **4**: 1.
- de Paula, L., C. L. Silva, *et al.* (2007). "Comparison of different delivery systems of DNA vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs." Genet Vaccines Ther **5**: 2.
- Didiano, D. and O. Hobert (2006). "Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions." Nat Struct Mol Biol **13**(9): 849-851.
- Donnelly, J. J., B. Wahren, *et al.* (2005). "DNA vaccines: progress and challenges." J Immunol **175**(2): 633-639.
- Du, C., C. Liu, *et al.* (2009). "MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis." Nat Immunol **10**(12): 1252-1259.
- Dupuis, M., K. Denis-Mize, *et al.* (2000). "Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice." J Immunol **165**(5): 2850-2858.
- Eulalio, A., E. Huntzinger, *et al.* (2008). "Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing." Cell **132**(1): 9-14.
- Fontana, L., E. Pelosi, *et al.* (2007). "MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation." Nat Cell Biol **9**(7): 775-787.
- Fontoura, I. C. (2009). Células B são importantes na geração de memória em modelo de vacinação com DNA-Hsp65. Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

- Gangaraju, V. K. and H. Lin (2009). "MicroRNAs: key regulators of stem cells." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 116-125.
- Greenland, J. R. and N. L. Letvin (2007). "Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines." Vaccine **25**(19): 3731-3741.
- Guo, H., N. T. Ingolia, *et al.* (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." Nature **466**(7308): 835-840.
- Gurunathan, S., D. M. Klinman, *et al.* (2000). "DNA vaccines: immunology, application, and optimization*." Annu Rev Immunol **18**: 927-974.
- Gurunathan, S., L. Stobie, *et al.* (2000). "Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells." J Immunol **165**(2): 915-924.
- Gurunathan, S., C. Y. Wu, *et al.* (2000). "DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity." Curr Opin Immunol **12**(4): 442-447.
- Haas, T., J. Metzger, *et al.* (2008). "The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation." Immunity **28**(3): 315-323.
- Hacker, H., P. H. Tseng, *et al.* (2011). "Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator." Nat Rev Immunol **11**(7): 457-468.
- Han, J., Y. Lee, *et al.* (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." Genes Dev **18**(24): 3016-3027.
- He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet **5**(7): 522-531.
- Heinrich, E. M. and S. Dimmeler (2012). "MicroRNAs and Stem Cells: Control of Pluripotency, Reprogramming, and Lineage Commitment." Circ Res **110**(7): 1014-1022.
- Hornung, V., A. Ablasser, *et al.* (2009). "AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC." Nature **458**(7237): 514-518.

- Hou, J., P. Wang, *et al.* (2009). "MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2." J Immunol **183**(3): 2150-2158.
- Huygen, K., J. Content, *et al.* (1996). "Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine." Nat Med **2**(8): 893-898.
- Ishii, K. J. and S. Akira (2006). "Innate immune recognition of, and regulation by, DNA." Trends Immunol **27**(11): 525-532.
- Ishii, K. J., T. Kawagoe, *et al.* (2008). "TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines." Nature **451**(7179): 725-729.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-995.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2010). "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." Science **327**(5963): 291-295.
- Johnnidis, J. B., M. H. Harris, *et al.* (2008). "Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223." Nature **451**(7182): 1125-1129.
- Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, *et al.* (2007). "Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease." Immunity **27**(4): 549-559.
- Karin, M. (2005). "The IkappaB kinase (IKK) complex as a critical regulator of immune responses." International Congress Series **1285**: 97-103.
- Kim, T., S. Pazhoor, *et al.* (2010). "Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(34): 15181-15186.
- Klinman, D. M. (2004). "Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides." Nat Rev Immunol **4**(4): 249-258.
- Koyama, S., K. J. Ishii, *et al.* (2007). "Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination." J Immunol **179**(7): 4711-4720.

- Krieg, A. M. (2006). "Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation." Nat Rev Drug Discov **5**(6): 471-484.
- Kruger, J. and M. Rehmsmeier (2006). "RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W451-454.
- Kuhn, D. E., M. M. Martin, *et al.* (2008). "Experimental validation of miRNA targets." Methods **44**(1): 47-54.
- Kumar, H., T. Kawai, *et al.* (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." Int Rev Immunol **30**(1): 16-34.
- Kumar, H., S. Koyama, *et al.* (2008). "Cutting edge: cooperation of IPS-1- and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses." J Immunol **180**(2): 683-687.
- Kutzler, M. A. and D. B. Weiner (2008). "DNA vaccines: ready for prime time?" Nat Rev Genet **9**(10): 776-788.
- Lee, Y., M. Kim, *et al.* (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23**(20): 4051-4060.
- Lichner, Z., E. Pall, *et al.* (2011). "The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells." Differentiation **81**(1): 11-24.
- Lindsay, M. A. (2008). "microRNAs and the immune response." Trends Immunol **29**(7): 343-351.
- Liu, G., A. Friggeri, *et al.* (2009). "miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(37): 15819-15824.
- Liu, L., Y. Jiang, *et al.* (2010). "Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide." Life Sci **86**(5-6): 192-198.
- Liu, M. A. (2003). "DNA vaccines: a review." J Intern Med **253**(4): 402-410.

- Lorenzi, J. C., A. P. Trombone, *et al.* (2010). "Intranasal vaccination with messenger RNA as a new approach in gene therapy: use against tuberculosis." BMC Biotechnol **10**: 77.
- Lu, Y. C., W. C. Yeh, *et al.* (2008). "LPS/TLR4 signal transduction pathway." Cytokine **42**(2): 145-151.
- Maere, S., K. Heymans, *et al.* (2005). "BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks." Bioinformatics **21**(16): 3448-3449.
- Malardo, T. (2009). Avaliação do uso de baixas doses de DNA plasmideal no controle de processos inflamatórios. Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.
- McCoy, C. E., F. J. Sheedy, *et al.* (2010). "IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors." J Biol Chem **285**(27): 20492-20498.
- Miyake, K. (2007). "Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors." Semin Immunol **19**(1): 3-10.
- Muljo, S. A., K. M. Ansel, *et al.* (2005). "Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer." J Exp Med **202**(2): 261-269.
- Niu, Y., D. Mo, *et al.* (2011). "Lipopolysaccharide-induced miR-1224 negatively regulates tumour necrosis factor-alpha gene expression by modulating Sp1." Immunology **133**(1): 8-20.
- O'Connell, R. M., D. S. Rao, *et al.* (2010). "Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system." Nat Rev Immunol **10**(2): 111-122.
- O'Neill, L. A., F. J. Sheedy, *et al.* (2011). "MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **11**(3): 163-175.
- Oganesyan, G., S. K. Saha, *et al.* (2006). "Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response." Nature **439**(7073): 208-211.

- Ohdaira, H., M. Sekiguchi, *et al.* (2012). "MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells." Cell Prolif **45**(1): 32-38.
- Padilha, E. (2011). Uso do RNAmhsp65 em conjunto com drogas convencionais (imuno drogas) para tratamento de cepas MDR de *Mycobacterium tuberculosis*. Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.
- Perkins, N. D. (2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 49-62.
- Quinn, S. R. and L. A. O'Neill (2011). "A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling." Int Immunol **23**(7): 421-425.
- Rehmsmeier, M., P. Steffen, *et al.* (2004). "Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes." RNA **10**(10): 1507-1517.
- Rice, J., C. H. Ottensmeier, *et al.* (2008). "DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer." Nat Rev Cancer **8**(2): 108-120.
- Rosada, R. S., L. G. de la Torre, *et al.* (2008). "Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes." BMC Immunol **9**: 38.
- Ruppert, S. M., M. Chehtane, *et al.* (2012). "JunD/AP-1-mediated gene expression promotes lymphocyte growth dependent on interleukin-7 signal transduction." PLoS One **7**(2): e32262.
- Saito, T. and P. Saetrom (2010). "MicroRNAs--targeting and target prediction." N Biotechnol **27**(3): 243-249.
- Schroeder, A., O. Mueller, *et al.* (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." BMC Mol Biol **7**: 3.
- Shannon, P., A. Markiel, *et al.* (2003). "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." Genome Res **13**(11): 2498-2504.

- Sheedy, F. J., E. Palsson-McDermott, *et al.* (2010). "Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21." Nat Immunol **11**(2): 141-147.
- Smoot, M. E., K. Ono, *et al.* (2011). "Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization." Bioinformatics **27**(3): 431-432.
- Sonkoly, E. and A. Pivarsci (2011). "MicroRNAs in inflammation and response to injuries induced by environmental pollution." Mutat Res **717**(1-2): 46-53.
- Spies, B., H. Hochrein, *et al.* (2003). "Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice." J Immunol **171**(11): 5908-5912.
- Taganov, K. D., M. P. Boldin, *et al.* (2006). "NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12481-12486.
- Takaoka, A., Z. Wang, *et al.* (2007). "DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response." Nature **448**(7152): 501-505.
- Tang, D. C., M. DeVit, *et al.* (1992). "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response." Nature **356**(6365): 152-154.
- Theofilopoulos, A. N., D. H. Kono, *et al.* (2011). "Intracellular nucleic acid sensors and autoimmunity." J Interferon Cytokine Res **31**(12): 867-886.
- Tili, E., J. J. Michaille, *et al.* (2007). "Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock." J Immunol **179**(8): 5082-5089.
- Trombone, A. P., C. L. Silva, *et al.* (2007). "Endocytosis of DNA-Hsp65 alters the pH of the late endosome/lysosome and interferes with antigen presentation." PLoS One **2**(9): e923.
- Tsang, S. L., P. C. Leung, *et al.* (2007). "Characterization of murine interferon-alpha 12 (MuIFN-alpha12): biological activities and gene expression." Cytokine **37**(2): 138-149.

- Ulmer, J. B., B. Wahren, *et al.* (2006). "Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances." Trends Mol Med **12**(5): 216-222.
- Unterholzner, L., S. E. Keating, *et al.* (2010). "IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA." Nat Immunol **11**(11): 997-1004.
- van Pesch, V., H. Lanaya, *et al.* (2004). "Characterization of the murine alpha interferon gene family." J Virol **78**(15): 8219-8228.
- Vigorito, E., K. L. Perks, *et al.* (2007). "microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells." Immunity **27**(6): 847-859.
- Vilaysane, A. and D. A. Muruve (2009). "The innate immune response to DNA." Semin Immunol **21**(4): 208-214.
- Wagner, H. (2004). "The immunobiology of the TLR9 subfamily." Trends Immunol **25**(7): 381-386.
- Wagner, H. and S. Bauer (2006). "All is not Toll: new pathways in DNA recognition." J Exp Med **203**(2): 265-268.
- Wang, X. (2008). "miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface." RNA **14**(6): 1012-1017.
- Wang, X. and I. M. El Naqa (2008). "Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals." Bioinformatics **24**(3): 325-332.
- Winter, J., S. Jung, *et al.* (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." Nat Cell Biol **11**(3): 228-234.
- Xiao, C., D. P. Calado, *et al.* (2007). "MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb." Cell **131**(1): 146-159.
- Xiao, C. and K. Rajewsky (2009). "MicroRNA control in the immune system: basic principles." Cell **136**(1): 26-36.

- Yang, P., H. An, *et al.* (2010). "The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway." Nat Immunol **11**(6): 487-494.
- Yasuda, K., H. Wagner, *et al.* (2006). "Role of immunostimulatory DNA and TLR9 in gene therapy." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **23**(2): 89-110.
- Yasuda, K., P. Yu, *et al.* (2005). "Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways." J Immunol **174**(10): 6129-6136.
- Yi, R., Y. Qin, *et al.* (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-3016.
- Zhang, X., T. W. Brann, *et al.* (2011). "Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN." J Immunol **186**(8): 4541-4545.

Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 129/2010, sobre o projeto intitulado “*Análise da sinalização intracelular em células estimuladas com baixas doses de DNA plasmideal*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 30 de agosto de 2010.

(We certify that the protocol nº 129/2010, about “*Intracellular cell signaling analysis with low doses of plasmideal DNA stimuli*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 08/30/2010.

Ribeirão Preto, 30 de agosto de 2010.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal